

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Kateřina Krížová

Diplomová práce

Morfologická a fylogenetická charakterizace tetratrichomonád
skupiny A

Morphological and phylogenetic characterization of
tetratrichomonads of group A

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného či stejného akademického titulu.

V Praze, 14. srpna 2013

Kateřina Krížová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D., bez jehož rad a pomoci by tato práce jen těžko vznikla. Děkuji také své rodině za trpělivost, shovívavost a zázemí, které mi během celého studia poskytovali.

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 6 |
| Abstract | 7 |
| 1. Úvod a cíle | 8 |
| 2. Literární úvod | 9 |
| 2.1 Charakteristika skupiny Parabasalia | 9 |
| 2.2 Trichomonas – group..... | 10 |
| 2.3. Rod Tetratrichomonas..... | 11 |
| 2.3.1. Monofylie rodu <i>Tetratrichomonas</i> | 12 |
| 2.3.2. Vztahy uvnitř rodu <i>Tetratrichomonas</i> | 15 |
| 2.3.3. Morfologie jednotlivých linií..... | 16 |
| 2.3.4. Hostitelská specifita linií skupiny A | 18 |
| 3. Materiály a metody | 20 |
| 3.1. Izolace a kultivace..... | 20 |
| 3.1.1. Médium Dobell-Leidlaw (1926)..... | 20 |
| 3.2. Morfologická analýza | 21 |
| 3.2.1. Barvení protargolem dle Bodiana..... | 21 |
| 3.3. Fylogenetická analýza..... | 23 |
| 3.3.1. Izolace DNA..... | 23 |
| 3.3.2. Amplifikace DNA..... | 23 |
| 3.3.3. Gelová elektroforéza | 24 |
| 3.3.4. Přečištění PCR produktu..... | 24 |
| 3.3.5. Sekvence DNA..... | 24 |
| 3.3.6. Klonování PCR produktů..... | 24 |
| 3.3.7. Vyhodnocení a analýza sekvencí | 26 |
| 4. Výsledky..... | 28 |
| 4.1. Izoláty | 28 |
| 4.2. Kontrolně osekvenované starší izoláty..... | 29 |
| 4.3. Fylogenetická analýza..... | 30 |
| 4.3.1. Analýza SSU rDNA sekvencí..... | 30 |
| 4.3.2. Analýza sekvencí regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 | 33 |
| 4.4. Morfologická analýza | 35 |
| 4.4.1. Měření buněk | 35 |

| | |
|--|----|
| 4.4.2. Morfologie linie 1 | 37 |
| 4.4.3. Morfologie linie 2 | 38 |
| 4.4.4. Morfologie linie 3 | 39 |
| 4.4.5. Morfologie linie 4 | 40 |
| 4.4.6. Morfologie linie 5 | 41 |
| 4.4.7. Morfologie linie 7 | 43 |
| 4.4.8. Morfologie linie 8 | 44 |
| 4.4.9. Morfologie linie 10 | 45 |
| 4.4.10. Morfologie ovčí linie..... | 45 |
| 4.4.11. Morfologie izolátu KOZA2 | 47 |
| 5. Diskuze..... | 48 |
| 5.1. Fylogenetická analýza..... | 48 |
| 5.1.2. sekvence SSU rDNA | 48 |
| 5.1.3. Sekvence ITS regionu..... | 49 |
| 5.2. Morfologická analýza | 51 |
| 5.2.1. Liší se morfologicky skupiny A a B ? | 51 |
| 5.2.2. Liší se jednotlivé linie v rámci skupiny A ?..... | 51 |
| 5.2.3. Odpovídají jednotlivé linie skupiny A některým z již popsaných druhů? | 56 |
| 5.2.4. <i>Tetratrichomonas ovis</i> | 63 |
| Závěrečné shrnutí..... | 64 |
| Seznam citované literatury..... | 65 |

Abstrakt

Trichomonády jsou skupina anaerobních jednobuněčných eukaryotických organismů, které se v současné době řadí do říše Excavata (skupina Parabasalia), přestože nesdílí žádný z typicky exkavátních znaků (charakteristické uspořádání cytoskeletu a ventrální potravní rýha). Toto zařazení bylo provedeno pouze na základě molekulárně – fylogenetických metod. Rod *Tetratrichomonas* obsahuje asi nejvíce známých druhů v rámci skupiny Parabasalia, které mohou infikovat obratlovce a nejen je. Na základě fylogenetických analýz byl celý rod rozdělen na dvě skupiny, A a B. Skupina A, které se tato diplomová práce věnovala, byla do současné doby rozdělena na 12 linií (linie 1 – 10, novel lineage 2, linie LP). Nám se podařilo objevit další linii, patřící do této skupiny, zde nazývaná linie ovce. Její postavení v rámci této skupiny je však zatím nejasné. Postavení ostatních linií, které bylo publikováno již dříve, bylo více či méně potvrzeno.

Morfologické odlišnosti jednotlivých linií, které by potvrdily předchozí fylogenetické analýzy, byly do této chvíle pouze předpokládány. V této práci byly tyto rozdíly celkem podrobně popsány. Je zjevné, že téměř všechny linie či skupiny linií jsou od sebe odlišitelné i na základě morfologických znaků (velikost a tvar těla, počet předních bičíků, velikost parabasálního aparátu, výška pely, síla kosty) a tvoří tak jednotlivé druhy ve smyslu morfospecies. Na základě těchto popsaných znaků bylo provedeno přiřazení k některým z již popsaných druhů tetratrichomonád. Linie 1 a 2, které byly od sebe morfologicky prakticky neodlišitelné, byly přiřazeny ke druhu *Tetratrichomonas ovis*. Linie 4 a 5, které taktéž sdílely společné morfologické znaky, zase odpovídaly popisu *Tetratrichomonas brumpti*. Linie 7 byla přiřazena ke druhu *Tetratrichomonas buttreyi*, který byl izolován z prasat. Linie 10 by dle našeho mínění mohla odpovídat popisu „*Tetratrichomonas ovis*“, resp. *Tetratrichomonas pavlovi*, jelikož jde nejspíš o shodné organismy. Nově objevená linie ovcí svým popisem nejvíce odpovídá druhu *Tetratrichomonas didelphidis*, resp. *Tetratrichomonas guttula*, nicméně zde je to určení zatím velmi nejisté a bude potřeba dalších analýz.

Klíčová slova: *Tetratrichomonas*, morfologie, linie ovcí, *Tetratrichomonas ovis*

Abstract

Trichomonads is a group of anaerobic single-celled eukaryotes currently classified in the kingdom Excavata (phylum Parabasalia), although does not share any of typically excavate features (the characteristic arrangement of the cytoskeleton and the ventral feeding groove). The taxonomy is based only on the molecular-phylogenetic analyses.

Genus *Tetratrichomonas* contains probably the highest number of known species within the phylum Parabasalia, parasites and commensals of numerous vertebrate and invertebrate hosts. According to phylogenetic methods the genus has been divided into group A and B. This thesis is focused on the group A, which is split into 12 lineages (lineage 1 – 10, novel lineage 2, lineage LP). During our survey we discovered a new lineage - called sheep lineage, related to this group. Its position in group A is still unclear. Morphological differences between lineages have more or less confirmed the position of other lineages in phylogeny based taxonomy tree, which has been published previously.

In this work, the differences between lineages have been described detailly. It is obvious that almost all lineages or groups of lineages are distinguishable from each other on the basis of morphological characters (size and shape of the body, the number of anterior flagella, parabasal body size, height of microtubular axostyle-pelta complex, thickness of costa) and form a single species, morfospecies. Based on described features some lineages have been assigned to already described species. Lineages 1 and 2, which were morphologically indistinguishable, were assigned to species *Tetratrichomonas ovis*. Lineages 4 and 5, which shared common morphological features correspond to the description of *Tetratrichomonas brumpti*. Lineage 7 has been assigned to *Tetratrichomonas buttreyi*, which has been isolated from pigs. According to our opinion lineage 10 could match with the description of "*Tetratrichomonas ovis*", respectively *Tetratrichomonas pavlovi*. The newly discovered sheep lineage can be related to *Tetratrichomonas didelphidis*, respectively *Tetratrichomonas guttula*, however its classification is very uncertain and will require further analysis.

Key words: *Tetratrichomonas*, morphology, sheep lineage, *Tetratrichomonas ovis*

1. Úvod a cíle

Rod *Tetratrichomonas* je jeden z nejpočetnějších rodů skupiny Parabasalia, jehož zástupci mohou parazitovat mnoho rozličných hostitelů. Na základě fylogenetických analýz bylo zjištěno, že se dělí na několik linií. Tyto linie pak tvoří dvě skupiny, A a B. Přesné pozice jednotlivých linií nejsou zcela jasné a také chybí detailnější morfologický popis těchto linií.

Cíle:

1. Potvrdit či vyvrátit dosud publikované fylogenetické analýzy (pozice jednotlivých linií), osekvenovat starší i zcela nové izoláty.
2. Zjistit, zda se od sebe morfologicky liší skupiny A a B.
3. Určit, zda existují morfologické rozdíly mezi jednotlivými liniemi skupiny A a následně je i popsat.
4. Pokusit se přiřadit jednotlivé linie dle morfologických znaků k již popsaným druhům.

2. Literární úvod

2.1 Charakteristika skupiny Parabasalia

Rod *Tetratrichomonas* patří do skupiny trichomonád (Parabasalia), jednobuněčných bičíkatých anaerobních eukaryot. Parabasalia jsou v současnosti řazena do říše Excavata a skupiny Metamonada (Cavalier-Smith, 2002; Adl et al., 2012). V rámci říše Excavata jsou trichomonády zástupci tzv. „neexkavátních exkavát“. Nesdílí tedy morfologické znaky, které jsou pro tuto říši charakteristické, tzn. charakteristické uspořádání cytoskeletálního systému a ventrální potravní rýha, kterou prochází zpětný bičík. Do této skupiny jsou tedy řazeny jen na základě molekulárně-fylogenetických analýz.

V současné době je popsanych zhruba 450 druhů trichomonád (Adl et al. 2007). Naprostou většinu z tohoto počtu tvoří mutualisté či komenzálové ve střevech termintů či jiného hmyzu, kterým tak pomáhají při trávení celulózy. Zbylá část je tvořena zástupci, kteří byli popsáni z trávicího traktu obratlovců (zde obvykle obývají distální část trávicího traktu). Volně žijících druhů je pak prozatím naprosté minimum (Cepicka et al. 2010; Yubuki et al. 2010). Některé z popsanych endobiotických trichomonád jsou významnými patogeny člověka a domácích zvířat, např. *Trichomonas vaginalis*, *Histomonas meleagridis*, *Tritrichomonas foetus* aj.

Parabasalia jsou charakteristická především přítomností modifikované mitochondrie, zde nazývané hydrogenozom. Dalšími znaky jsou pak přítomnost parabazálního aparátu (Golgiho aparát s asociovanými žíhanými fibrilami - GA se u skupiny Parabasalia vyskytuje jako u jediné linie skupiny Metamonada), typ jaderného dělení, tzv. kryptopleuromitóza (uzavřená pleuromitóza s extranukleárním dělicím vřeténkem) a typická stavba mastigontu a cytoskeletu.

Základním schématem karyomastigontu je jádro a čtyři kinetozomy (bazální tělíska), tři anteriorní a jeden rekurentní, nesoucí zpětný bičík (Brugerolle, 1991a). Ten může být asociován s povrchovým cytoskeletem buňky za vzniku undulující membrány. Tato struktura usnadňuje pohyb ve vazkém prostředí, a jelikož může být asociována s povrchem buňky různou měrou a silou, jde o dobrý diagnostický znak.

V současné době se Parabasalia rozdělují na šest tříd: Hypotrichomonadea, Trichomonadea, Tritrichomonadea, Cristamonadea, Trichonymphea a Spirotrichonymphea

(Čepička et al., 2010). Tetratrichomonády patří do třídy Trichomonadea, která je charakterizována jediným karyomastigontem se 2-6 bičíky a absencí hřebenovité struktury a infrakinetozomálního tělíska (Brugerolle, 1991b; Čepička et al., 2010). Většina zástupců této třídy má na svém těle lameliforní undulující membránu. Jako jediná ze všech šesti tříd v sobě zahrnuje kromě endobiotických zástupců i zástupce volně žijících trichomonád (Yubuki et al. 2010). Na základě analýzy SSU rDNA se dále zjistilo, že celá třída Trichomonadea se rozpadá do dvou skupin. První skupina je reprezentována řádem Trichomonadida, druhá pak řádem Honigbergiellida, který se dále rozpadá na čeledi Hexamastigidae, Tricercomitidae a Honigbergiellidae (Čepička et al., 2010). Čeleď Trichomonadidae je unikátní v rámci celé skupiny Parabasalia, jako jediná má totiž pod svou undulující membránou výztuhu ve formě kosty typu B, ostatní skupiny mohou mít také podobnou výztuhu, ovšem jenom ve formě kosty typu A. Původní počet bičíků u této čeledi byl pravděpodobně pět (čtyři přední a jeden zpětný), místo čtyř. Tato čeleď se (dle Čepička et al., 2010) dále dělí na dvě skupiny, tzv. *Trichomonas*-group a *Pentatrichomonas*-group. V této skupině byla nalezena výjimka u volně žijících druhů *Pseudotrichomonas keilini* a *Lacusteria cyprica*, které byly na základě fylogenetické analýzy zařazeny do skupiny *Pentatrichomonas*-group. Pravděpodobně u nich došlo k druhotné ztrátě kosty a tato struktura jim tedy zcela chybí (Yubuki et al., 2010). Námi zkoumaný rod *Tetratrichomonas* je nejdiverzifikovanější v rámci celé skupiny *Trichomonas*-group. Spolu s ním do této skupiny ještě patří rody *Trichomonas*, *Trichomonoides* a *Pentatrichomonoides*.

2.2 Trichomonas – group

Spolu s rodem *Tetratrichomonas*, který nás bude dále zajímat, do této skupiny patří ještě další tři rody.

Prvním z nich je rod *Trichomonas*, jehož zástupci mohou patřit mezi opravdové patogeny. Izolováni byli jak ze střev, tak z ústní dutiny, dále pak z urogenitálního traktu či dalších vnitřních orgánů ptáků a savců. Od rodu *Tetratrichomonas* se odlišuje undulující membránou. Tu má na rozdíl od tetratrichomonád kratší než tělo a undulující membrána také dále nepokračuje volným zpětným bičíkem.

Rod *Trichomonoides* je reprezentován jediným zástupcem, kterého se podařilo izolovat ze střeva termitů. *Trichomonoides trypanoides* je téměř totožný se zástupci rodu

Tetratrichomonas, liší se jen přítomností paraxonemální fibrily ve zpětném bičíku (Cepicka et al., 2010). Půjde tedy pravděpodobně jen o nepatrně modifikovanou tetratrichomonádu.

Výrazně modifikovanější je poslední ze skupiny *Trichomonas*-group, rod *Pentatrichomonoides*. Jeho charakteristickým znakem je subpelikulární korzet, jenž byl vytvořen z axostylárních mikrotubulů (Brugerolle et al., 1994).

2.3. Rod *Tetratrichomonas*

Rod *Tetratrichomonas* má pravděpodobně nejvíce zástupců z celé skupiny Parabasalia, kteří mohou infikovat obratlovce.

Charakteristická pro tento rod je především přítomnost čtyř anteriorních bičíků (i když, jak se ukazuje, počet předních bičíků nemusí být vždy spolehlivý znak), dlouhý zpětný (posteriorní) bičík, asociovaný s dobře vyvinutou undulující membránou, volný distální konec zpětného bičíku a typický diskovitý tvar parabazálního aparátu. Výjimka je druh *T. limacis*, kde je parabazální aparát dvouramenný (Kozloff, 1945).

Jednotlivé druhy rodu *Tetratrichomonas* se nejčastěji vyskytují v zadní části střev rozličných hostitelů. Zaznamenán byl výskyt u všech tříd tetrapod ale například také u měkkýšů, ryb či pijavek (Alexeieff, 1910, 1911).

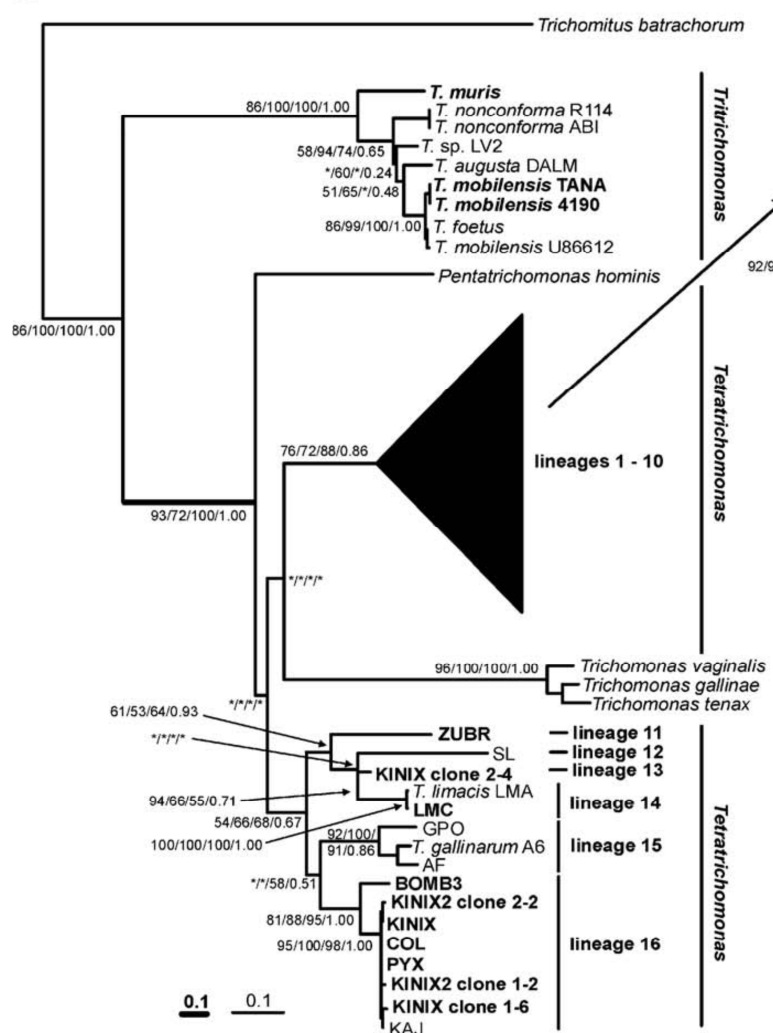
Problémem je hostitelská specifita tetratrichomonád a potažmo celé skupiny Parabasalia. U některých druhů, např. *Tetratrichomonas gallinarum* nebo *T. prowazeki*, byli jedinci nalezeni napříč skupinami nepříbuzných organismů. V případě *T. gallinarum* byla potvrzena infekce jak lidí, tak ptáků (Cepicka et al., 2005; Kutisova et al. 2005), u *T. prowazeki* u obojživelníků a plazů (Honigberg, 1951). Jiné druhy tetratrichomonád však infikovaly jen úzké spektrum hostitelů, např. *T. limacis* slimáky (Kozloff, 1945), *T. buttreyi* sudokopytníky (Hibler et al., 1960), *T. microti* hlodavce (Wenrich a Saxe, 1950).

V roce 2006 byl proveden výzkum 53 izolátů rodu *Tetratrichomonas* (Cepicka et al., 2006). Zaměřoval se především na otázku monofylie skupiny *Tetratrichomonas* a také na vztahy uvnitř této skupiny. Analýza byla provedena na sekvencích ITS1-5.8S, rDNA-ITS2, SSU rDNA a genu pro α -tubulin.

2.3.1. Monofylie rodu *Tetratrichomonas*

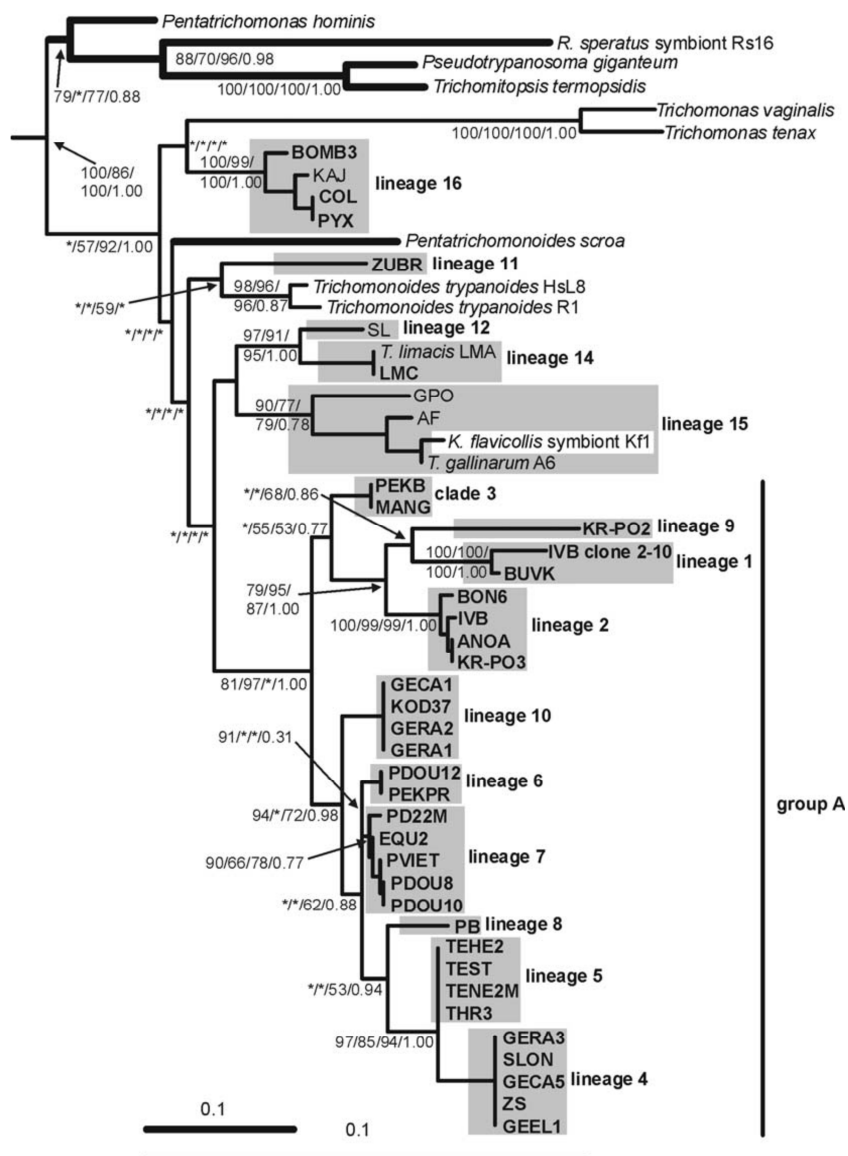
Otázka monofylie byla ve výsledku této studie nejednoznačná. Ve fylogenetickém stromu sestaveném na základě datasetu obsahující pouze sekvence ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (obr. 1) se zdál být rod *Tetratrichomonas* parafyletický, nicméně statistická podpora pro toto tvrzení byla velmi nízká. Na základě AU testu tak monofylie nebyla vyloučena.

A



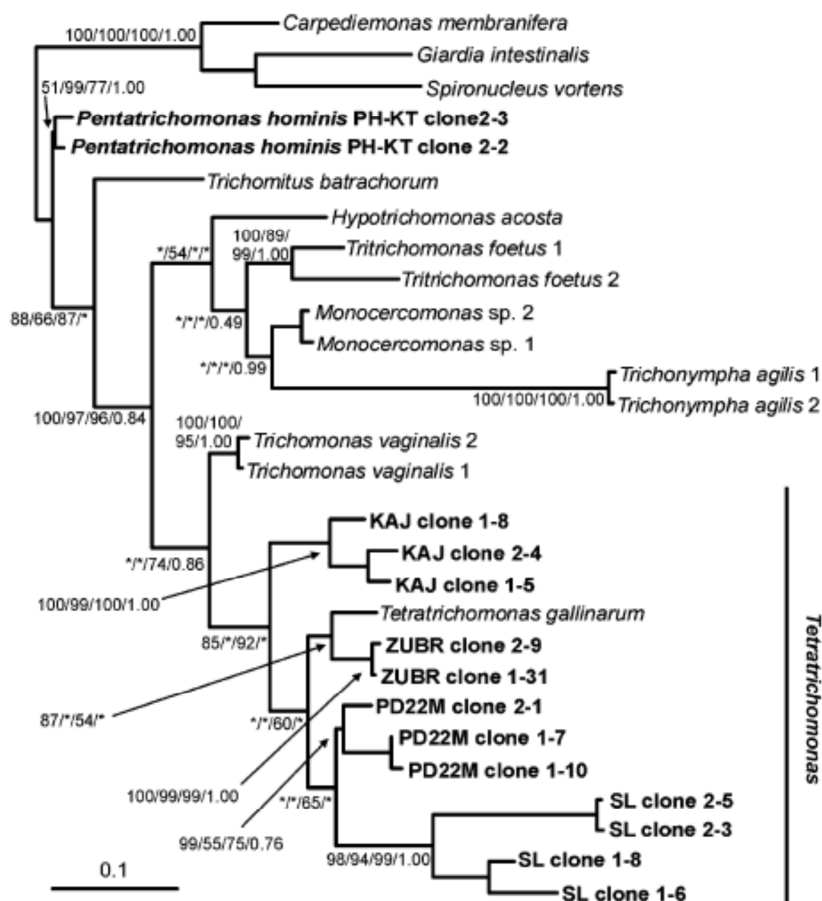
Obr.1 Fylogenetický strom sestavený na základě sekvencí regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Převzato z Cepicka et al., 2006.

Následně byl sestaven strom na základě analýzy SSU rDNA sekvencí jednotlivých izolátů (obr. 2). I v tomto stromě vyšel rod *Tetratrichomonas* jako parafyletický. Rody *Trichomonas*, *Trichomonoides* a v některých analýzách i rod *Pentatrichomonoides*, tvořily vnitřní větve celého rodu *Tetratrichomonas*. AU test však v tomto případě monofylii zcela vyloučil.



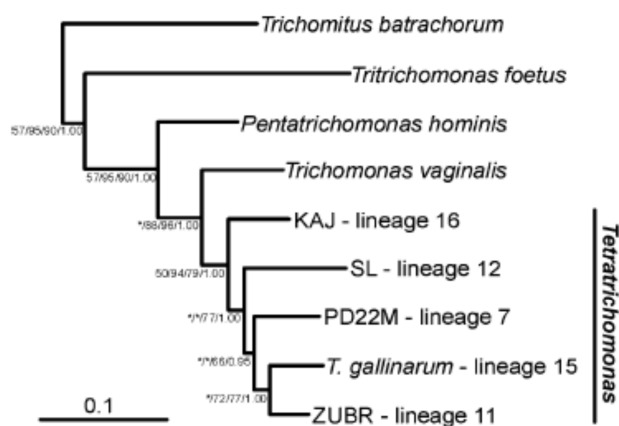
Obr. 2 Fylogenetický strom sestavený na základě sekvencí genu pro SSU rRNA. Převzato z Cepicka et al., 2006.

Monofylie rodu *Tetratrichomonas* byla prokázána až díky stromu rekonstruovaném ze sekvencí genu pro α -tubulin na základě všech metod kromě Bayesovské metody (obr. 3). V Bayesovské metodě se rod ukázal jako parafyletický, se skupinou *Trichomonas* jako se svou vnitřní větví. Tato vnitřní větev však zaujímala odlišnou pozici, než tomu bylo v analýzách pro ITS1-5.8S rDNA-ITS2 a SSU rDNA sekvence. Rod *Pentatrichomonas* byl také s relativně vysokou statistickou podporou umístěn na bázi skupiny Parabasalia, což způsobilo, že skupina Trichomonadidea se stala polyfyletickou. Taktéž pozice *Trichonympha agilis* a *Hypotrichomonas acosta* neodpovídaly pozicím z předcházejících analýz.



Obr.3 Fylogenetický strom sestavený na základě sekvencí genu pro α -tubulin. Převzato z Cepicka et al., 2006.

Se statistickou podporou 50 – 94 % se rod *Tetratrichomonas* ukázal monofyletický až na základě analýzy konkatenátu lokusů obsahující zástupce všech tří hlavních linií rodu *Tetratrichomonas*. *Trichomonas vaginalis* zde zaujímá sesterskou pozici k linii *Tetratrichomonas* a druh *Pentatrichomonoides hominis* je bazální k oběma rodům.



Obr. 4 Fylogenetická strom sestavený na základě konkatenátu sekvencí genů pro α -tubulin, SSU rRNA a ITS1-5.8 rRNA-ITS2. Převzato z Cepicka et al., 2006.

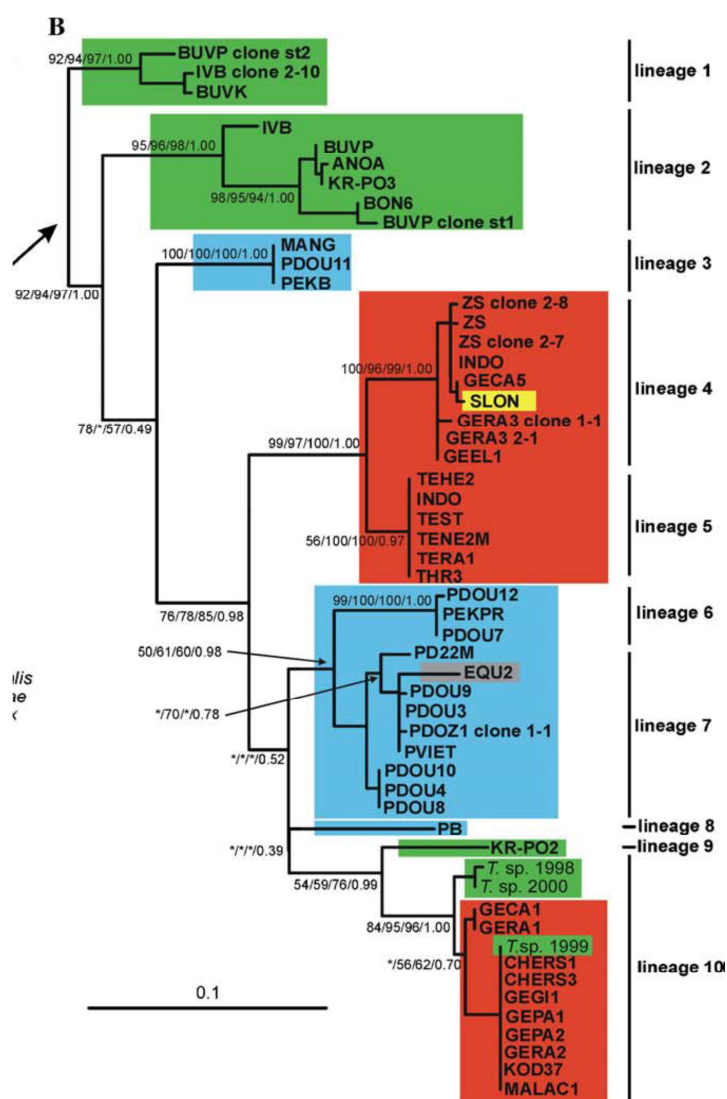
2.3.2. Vztahy uvnitř rodu *Tetratrichomonas*

Na základě sekvencí regionů ITS1-5.8S rRNA-ITS2 byl sestaven fylogenetický strom odkrývající vztahy uvnitř rodu *Tetratrichomonas* (obr. 1). Je zjevné, že celý rod byl tvořen 16 dobře statisticky podpořenými liniemi s vysokým stupněm hostitelské specifity. V současné době je těchto 16 linií dále rozšířeno. Přibýly jak linie ve skupině A (Dufernez et al., 2007; Mantini et al., 2009; Smejkalová et al., 2012), tak ve skupině B – novel lineage 1 (Smejkalová et al., 2012), a komplex druhů *Tetratrichomonas gallinarum*, který se stále rozrůstá (Cepicka et al., 2005; Laing et al., 2013. Dimasuay and Rivera, 2013). Všechny tyto linie tvoří dvě oddělené skupiny. Linie 1 – 10 (Cepicka et al., 2006), linie LP (Mantini et al., 2009) a novel lineage 2 (Smejkalová et al., 2012) tvoří skupinu A, linie 11 – 16, novel lineage 1 (Smejkalová et al., 2012) pak skupinu B. V tomto fylogenetickém stromě měla skupina A střední statistickou podporu, skupina B pak celkem nízkou. Sekvenčně nejvíc podobné si na základě tohoto stromu byly linie 9, 10 a 4, 5. Mezi *Tetratrichomonas* byl zařazen i vzorek izolovaný z reprodukčních orgánů býků, kteří dosud nebyli sexuálně aktivní (Corbeil et al., 2008). Bohužel jakýkoliv podrobnější fylogenetický či morfologický popis tohoto vzorku chybí. Další nový vzorek tetratrichomonád byl izolován z předkožky býků (Huby-Chilton et al., 2009). Tento vzorek se sekvenčně velmi podobal vzorku 2003-5003 (Dufernez et al., 2007). Další z nových vzorků, tentokrát izolovaný z mravenečníka (*Myrmecophaga tridactyla*) (Ibañez-Escribano et al., 2013) se sekvenčně naprosto shodoval se vzorky izolovanými z předkožky býků (Huby-Chilton et al., 2009) a s izoláty *Tetratrichomonas brumpti* z želv rodu *Geochelone*. S druhem *Tetratrichomonas buttreyi* (Hibler et al., 1960) byly shodné izoláty nalezené v poslední době v dobytku a prasatech z Filipín (Dimasuay and Rivera, 2013).

Detailnější vztahy uvnitř skupiny A byly zkoumány odděleně. Výsledkem této separátní analýzy byl strom, který byl uměle zakořeněn linií 1 (obr. 5). Linie 2 a 3 vytvořily dvě bazální linie ke klastru 4 - 10.

Analýza sekvencí SSU rDNA (obr. 2) potvrdila 16 linií, které byly díky předchozí analýze objeveny (Cepicka et al., 2006). Skupina A byla velmi dobře statisticky podpořena, nicméně vztahy uvnitř této skupiny již tak vysokou podporu neměly. Výjimku tvořila společná větev linií 1, 2 a 9, která se u předcházející analýzy neobjevila. To však mohl být artefakt způsobený dlouhou větví linie 9. Linie 11 – 16 tvořily parafyletickou skupinu, ačkoli všechny

tyto linie sdílely specifickou inzerci 10 nukleotidů. Celá skupina A pak sdílí dvě inserce o délce 15 až 20 nukleotidů. V tomto stromu se nejvíce sekvenčně podobaly linie 6, 7 a 4, 5.



Obr. 5 Fylogenetický strom sestavený na základě sekvencí regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2, detail skupiny A. Převzato z Cepicka et al., 2006.

2.3.3. Morfologie jednotlivých linií

Morfologická data z tohoto výzkumu (protargolem barvené izoláty) jsou dostupná pouze pro linie 1, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15 a 16. Zcela však chybí jakákoliv obrazová dokumentace zmíněných morfologických znaků. Nedostatečný je však i popis. Pro všechny izoláty jednotlivých linií platí, že sdílí veškeré charakteristické znaky typické pro rod *Tetratrichomonas*, popsané výše.

Morfologie linie 1 a 2 zcela neodpovídala morfologii klasických tetratrichomonád, a to především počtem předních bičíků. U těchto zástupců se totiž nejčastěji vyskytovali jedinci se dvěma či třemi předními bičíky. U jednoho z izolátů (IVB) se dokonce u 75 % jedinců vyskytovaly pouze dva přední bičíky. Undulující membrána u zástupců těchto dvou linií byla vysoce spirální a zasahovala jen do poloviny těla buňky. U výše zmíněného izolátu IVB byl volný distální konec zpětného bičíku dokonce dlouhý jako celé tělo buňky. Další z obarvených struktur, pelta a axostyl, byly velmi slabě vyvinuty. Parabasální aparát měl diskovitý tvar jako tomu bývá u klasických tetratrichomonád.

Linie 4 a 5 byly morfologicky totožné a připomínaly druh již popsáný, *Tetratrichomonas brumpti* (Honigberg, 1951). K tomuto druhu byly na základě fylogenetických analýz přiřazeny zástupci tzv. group B (Dufernez et al., 2007), i když sám autor je na základě morfologických znaků spíše řadil k druhu *Tetratrichomonas buttreyi* (Hibler et al., 1960). Další z autorů, který pravděpodobně izoloval stejný druh (na základě sekvenčního srovnání) jako v případě autorů Dufernez et al., 2007 již uvedl, že dle morfologických znaků jde pravděpodobně o druh *T. brumpti* (Huby-Chilton et al., 2009). Morfologie linie 7 byla taktéž totožná s již popsáným druhem, tentokrát šlo o druh *Tetratrichomonas buttreyi*, izolovaný z prasat (Hibler et al., 1960). Ultrastrukturální studie tohoto druhu byla provedena v roce 2008 (Rivera et al., 2008). Linie 8, zde zastoupena jen jedním izolátem PB, svou morfologií taktéž připomínala *T. buttreyi*, avšak s tím rozdílem, že její buněčné tělo bylo laterálně zploštělé. Dalším rozdílem je morfologie axostylu. Ten má po celé své délce, která vyčnívá z těla buňky, stejnou šířku, jen na jeho konci je krátká část, která se velmi náhle zužuje tak, že tvoří kónickou špičku axostylu.

Linie 10 svou morfologií připomíná druh *Tetratrichomonas buttreyi*, jde však o odlišný druh než ten, který byl zmiňován u linie 7. Zástupci tohoto druhu byli izolováni z dobytka, nikoliv z prasat. Tento druh popsali Jensen a Hammond (1964) a nemá nic společného s *T. buttreyi* z prasat, kterou popsal Hibler et al. v roce 1960. Charakteristický pro tuto linii je především poměrně silný axostyl, který má po celé své délce stejný průměr. Pelta je u této linie vysoká a i kosta je dobře vyvinuta. Jako *Tetratrichomonas buttreyi* byla popsána i tetratrichomonáda izolovaná býků (Cobo et al., 2003). Autor však uvádí, že obě *T. buttreyi* (z prasat i z dobytka) by mohly tvořit jeden druh a přikládá ultrastrukturální studii nalezeného druhu. Nejnovější objevená tetratrichomonáda z mravenečnicka byla na základě fylogenetických analýz přiřazena ke druhu *T. brumpti* (Honigberg, 1951), nicméně autoři

zmiňují, že morfologický popis neodpovídá tomuto popsaného druhu (Ibañez-Escribano et al., 2013). *T. brumpti* je podle jejich názoru jen linie 4 (Cepicka et al., 2006), linie 5 by pak mohla reprezentovat nový nepopsaný druh.

Jelikož se tato diplomová práce zaměřuje převážně na skupinu A, následující popis linie B bude jen velmi stručný.

Linie 11 byla velmi odlišná od všech ostatních tetratrachomonád, jelikož šlo o výrazně větší trichomonádu jen se třemi předními bičíky. Linie 12 byla nejprve popsána jako *T. prowazeki* (Cepicka et al., 2005), následně však díky fragmentovanému parabasálnímu aparátu bylo její zařazení přehodnoceno. Pravděpodobně se tedy bude jednat o zatím nepopsaný druh. Linie 14 reprezentuje druh *T. limacis* (Kozloff, 1945). Linie 15 byla určena jako druh *T. gallinarum* tak, jak ji popsal McDowell (1953), linie 16 pak jako *T. prowazeki* (Honigberg, 1951).

Linie 1, 2, 8 a 10 ze skupiny A pravděpodobně tedy reprezentují stále ještě nepopsané druhy tetratrachomonád. Popis těchto linií a potvrzení již popsanych druhů ze skupiny A bude obsahem této diplomové práce.

2.3.4. Hostitelská specifita linií skupiny A

Z obrázku č. 5 lze z barev jednotlivých polí zjistit, z jakého hostitele byly jednotlivé izoláty izolovány. Zelená barva odpovídá bovinním liniím (Bovinae), modrá označuje prasata a pekari (Suidae), červená želvy (Testudinidae), žlutá slona afrického (*Loxodonta africana*) a šedá koně (*Equus caballus*). Z tohoto barevného přehledu lze snadno vyčíst, že výskyt některých linií se omezuje pouze na jednu konkrétní taxonomickou skupinu hostitelů. Jde konkrétně o linie 1 a 2, které byly zatím zaznamenány jen u bovinních druhů, linie 4 a 5, vyskytující se u suchozemských želv a linie 6 a 7, jejichž výskyt byl prozatím zaznamenán u prasat a pekari. Výjimky pozorované u linie 4 a 7, které se vyskytovaly u koně a slona afrického, jsou považovány za náhodné.

U linie 10, ve které se objevovali zástupci izolovaní jak z želv, tak z dobytka, tento výskyt však za náhodný již považovat nelze. Společný výskyt u takto nepříbuzných organismů zde autor vysvětluje podobností stravy obou hostitelů (herbivorie a koprofágie), a tudíž i obdobnou fyziologií. Morfologicky linie 10 reprezentuje druh *Tetratrachomonas buttreyi* popsáný v 60. letech Jensenem a Hammondem (Jensen a Hammond, 1964). Tato *Tetratrachomonas buttreyi* izolovaná z dobytka je odlišná od původní *T. buttreyi* (Hibler et al.,

1960), která byla izolovaná z prasat, a to jak svou morfologií, tak svou pozicí ve fylogenetickém stromě. Pravděpodobně se tedy bude jednat o dva odlišné druhy.

U linií 4 a 5, které ve všech fylogenetických analýzách vždy ležely velmi blízko sebe, se pravděpodobně bude jednat o dva kryptické allopatrické druhy. Morfologicky jsou obě linie totožné a korespondují s druhem *Tetratrichomonas brumpti* (Honigberg, 1951). Navzájem odlišná je jen jejich hostitelská specifita a taktéž geografická distribuce. Zástupci linie 4 byli izolováni z tropického rodu želv *Geochelone*, naproti tomu izoláty linie 5 se vyskytovaly v palearktickém rodu želv *Testudo*.

3. Materiály a metody

3.1. Izolace a kultivace

Pro potřeby této diplomové práce byly použity jak nově izolované preparáty, tak preparáty zamražené. Nové izoláty byly izolovány z čerstvého trusu zkoumaných zvířat a následně přeočkovány do média Dobell-Leidlaw (1926). Starší izoláty byly vymraženy (zkumavka uchovávaná v tekutém dusíku se vhodí do vlažné vody, následně se obsah přeočkuje do média).

3.1.1. Médium Dobell-Leidlaw (1926)

Jedná se o dvoufázové médium. Pevná fáze je tvořena koňským sérem, které bylo po 1,5 ml rozplněno do zkumavek (skleněné či plastové). Zkumavky byly následně vloženy (šikmo položené) do autoklávu při 80 °C po dobu jedné hodiny, čímž bylo koňské sérum obsažené ve zkumavkách koagulováno. Proces koagulace se po 24 hodinách, kdy se zkumavky udržují v pokojové teplotě, opět opakuje. Proces sterilizace je opakován, aby se zabránilo růstu kontaminujících mikroorganismů, které by mohly následně znehodnotit celou kulturu. Zkumavky s hotovou pevnou složkou byly skladovány v lednici.

Tekutá fáze se skládala z 500 ml Ringerova roztoku (viz. tabulka 1) a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Ringerův roztok je dvousložkový a každá složka byla připravována a autoklávována zvlášť, aby nedošlo k vysrážení fosfátů, které jsou obsaženy ve složce A, chloridem vápenatým, který obsahuje složka B. Po vychladnutí obou složek byly opatrně smíchány a poté bylo přidáno 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Tekutá složka byla následně uchovávána v lednici. Před vlastním použitím ke kultivaci byla pevná fáze překryta 3 ml tekuté složky média.

| Roztok A | |
|---|-----------|
| NaCl | 3,25 g |
| NaHCO ₃ | 0,1 g |
| KCl | 0,07 g |
| NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O | 0,005 g |
| Destilovaná H ₂ O | do 450 ml |
| Roztok B | |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 0,08 g |
| Destilovaná H ₂ O | do 50 ml |

Tabulka č. 1

3.2. Morfologická analýza

Živé buňky byly pozorovány jen v průběhu kultivace kultur, pro potřeby této práce bylo nutné pozorování již obarvených buněk.

3.2.1. Barvení protargolem dle Bodiana

Fixace

Při tomto druhu barvení byla využívána fixace za vlhka. Bouine-Hollandova fixáž byla připravena rozpuštěním 25 g octanu měďnatého v destilované vodě. Ve vzniklém roztoku bylo následně rozpuštěno 40 g kyseliny pikrové. Následně bylo přidáno 100 ml 40% formaldehydu a vše bylo doplněné destilovanou vodou do konečného objemu 1 litru. Vzorky byly fixovány v Petriho miskách ve 30 ml fixáže smíchané s 1,5 ml ledové kyseliny octové.

Na odmaštěná krycí sklíčka byl nanesen 1 μ l suspenze buněk a toto sklíčko bylo ihned vhozeno do připravené Petriho misky s fixází (buňkami dolů tak aby plavalo na hladině). Po několika minutách bylo krycí sklíčko otočeno a ponořeno na dno Petriho misky. Fixáž lze tímto způsobem provádět 20 minut až několik hodin. Pro potřeby tohoto pokusu byla fixáž prováděna cca 20 minut. Po fixaci byly preparáty připevněny na připravené tyčinky z polyethylenu (předtím vrypem označena kultura a orientace) a ihned opláchnuty v 50% ethanolu. Následně byly ještě třikrát proprány v 70% ethanolu (zde mohou být uchovávány po delší dobu).

Barvení

1. Preparáty byly převedeny ze 70% ethanolu přes 50% ethanol do destilované vody.
2. Z destilované vody byly preparáty vloženy na pět minut do 0,5% roztoku manganistanu draselného (KMnO_4).
3. Po pěti minutách byly z roztoku vyjmuty a opláchnuty v destilované vodě (pětkrát po 30 s).
4. Po opláchnutí byly vloženy na pět minut do 5% roztoku kyseliny šťavelové.
5. Poté byly opláchnuty v destilované vodě (pětkrát po 30 s).
6. Po opláchnutí byly ještě mokré preparáty (nesmí vyschnout) vloženy do 1% roztoku protargolu ve svislé poloze. Roztok protargolu byl připraven těsně před jeho použitím. Na dno kádinky byl položen stočený a očištěný měděný drát (přibližně 5 g

na 100 ml protargolu). Na něj byl nalit roztok protargolu, který byl připravován v jiné kádince tak, že do nalité destilované vody byl nasypán protargol, který se nechal samovolně rozpustit. Do kádinky s již narovnanými preparáty byly následně vloženy ještě tenké měděné drátky.

7. Celá kádinka byla dobře uzavřena a na 48 hodin vložena do termostatu (do 37°C).
8. Po uplynutí příslušné doby byly obarvené preparáty opláchnuty v destilované vodě (dvakrát po 5 s).
9. Opláchnuté preparáty byly vloženy na 10 minut do redukčního roztoku (vodný roztok 1% hydrochinonu a 5% siřičitanu sodného).
10. Následně byly preparáty opláchnuty v destilované vodě (pětkrát po 30 s).
11. Opláchnuté roztoky byly na 5 minut vloženy do 0,5% roztoku chloridu zlatitého (při tomto kroku je nutné používat plastovou pinzetu, aby nedošlo k vysrážení koloidního zlata).
12. Preparáty byly opláchnuty dvakrát po 5 s v destilované vodě.
13. Následně byly preparáty na 5 minut vloženy do 2% roztoku kyseliny šťavelové.
14. Dalším krokem bylo opláchnutí preparátů v destilované vodě (pětkrát po 30 s).
15. Po opláchnutí byly preparáty vloženy do 5% roztoku thiosíranu sodného na 10 minut.
16. Preparáty byly následně propírány pod pomalu tekoucí vodou po dobu 15 až 20 minut.
17. Proprané preparáty byly převedeny alkoholovou řadou (50%, 70%, 80%, 96%, 100% ethanol) do xylenu.
18. V konečné fázi byla sklíčka montována na podložní skla do kapky DPX Mountant for histology. Sklíčka se nechala utuhnout ve vodorovné poloze alespoň 48 hodin.

Nabarvené preparáty byly následně pozorovány mikroskopem Olympus BX51 a fotografovány digitální kamerou Olympus DP71. Pořízené fotografie byly pomocí programu Quick PHOTO CAMERA 2.3 převedeny do formátu tiff. V některých případech bylo vyfoceno více fotek z různých rovin zaostření a ty pak byly skládány pomocí programu Helicon Focus do výsledné fotografie. Získané fotografie byly dále zpracovány a upraveny v programu Corel PHOTO-PAINT.

Délka buňky, šířka a délka vyčnívající části axostylu byly měřeny pomocí programu Quick PHOTO CAMERA 2.3. Měření bylo prováděno jen u nabarvených buněk. Délka těla byla

měřena bez bičíku a bez axostylu, šířka pak v nejširším místě těla spolu s undulující membránou.

3.3. Fylogenetická analýza

3.3.1. Izolace DNA

DNA z kultur byla izolována pomocí kitu QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) dle protokolu „Blood and Body fluid spin protocol“, nebo kitem ZR Genomic DNA II KitTM (Zymo Research) podle protokolu „Cell suspension and proteinase K digested samples“. Izolovaná DNA byla dlouhodobě uchovávána v mrazáku při -20°C.

3.3.2. Amplifikace DNA

Sekvence potřebné pro fylogenetické analýzy byly získány pomocí primerů ITSF (TTCAGTTCAGCGGGTCTTCC; Cepicka et al., 2006) a 16SF (TACTTGGTTGATCGTGCC; Tachezy et al., 2002). Celá tato amplifikovaná sekvence měla délku kolem 1800 nukleotidů.

Předpis složení směsi pro PCR

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| Combi PPP Master Mix (Top-Bio, ČR) | 25 µl |
| ITSF | 1,25 µl |
| 16SF | 1,25 µl |
| DNA | max 13 µl |
| Sterilizovaná MiliQ H ₂ O | doplnit do 50 µl |

PCR reakce probíhala v termocykléru při teplotním nastavení:

| | | | |
|-----|------|------------|----------------------|
| 1x | 94°C | 4 min | Počáteční denaturace |
| 31x | 94°C | 1 min | denaturace |
| | 61°C | 1 min | nasednutí primeru |
| | 72°C | 2 min 30 s | polymerace |
| 1x | 72°C | 10 min | závěrečná polymerace |

3.3.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla prováděna na 1% agarózovém gelu (0,5 mg agarózy; 50 ml TBE), ke kterému byly přidány 2 µl ethyidium bromidu. EtBr se váže na DNA a po ozáření UV zářením emituje světlo. Jako standard byly použity 2 µl GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. Výsledný obraz byl zpracován programem Alpha Digi Doc RT a následně vyfocen.

V žádném z případů nebylo nutné přistoupit k vyříznutí a přečištění jednotlivých pruhů, protože se vždy naamplifikoval jen jediný pruh s fragmenty o požadované délce.

3.3.4. Přečištění PCR produktu

Výsledný produkt PCR byl po provedení gelové elektroforézy přečištěn pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) podle přiloženého protokolu „QIA Quick PCR purification using a microcentrifuge“. Koncentrace DNA v přečištěném produktu PCR byla následně zjištěna pomocí spektrofotometru (NanoDrop ND-1000). Dle výsledné koncentrace bylo přidáno příslušné množství DNA do vzorku pro sekvenaci.

3.3.5. Sekvence DNA

Pro sekvenaci bylo nutné připravit vzorky smícháním templátové DNA (180 ng DNA), primeru a vody doplněné do celkového objemu 14 µl. Jako primery byly použity 1055F (GGTGGTGCATGGCCG), 1055R (CGGCCATGCACCACC), 665R (ATACWCTAAGCGTCCTG) a 514F (GTGCCAGCMGCCGCGG).

V případě izolátu HER5 bylo z důvodu společného výskytu rodu *Tetratrichomonas* a rodu *Honigbergiella* nutné přistoupit ke klonování.

3.3.6. Klonování PCR produktů

Příprava ligační směsi:

Mimo prostor laboratoře byla namíchána ligační směs. Byla použita T4 ligáza (1 µl), pGEM plasmidy (1 µl), ligační pufr (5 µl) a PCR produkt (3 µl). T4 ligázu bylo nutné držet na ledu,

směs byla po přidání ligázy rychle zakompletována, aby nedošlo k předčasnému uzavření plasmidů. Daná směs se nechala ligovat přes noc ve 4°C.

Příprava pro transformaci buněk:

1. Ke 100 µl kompetentních buněk bylo přidáno 10 µl ligační směsi. Tato směs byla ponechána 20 minut na ledu.
2. Po dvaceti minutách byla směs vložena do teploty 42°C na 45 s. Poté byly všechny vzorky z ohřívače opět přeneseny na 2 minuty na led.
3. Každá zkumavka byla poté doplněna do 1 ml LB médiem. Po přidání média se směs nechala inkubovat 90 minut při 37°C na 220rpm.
4. Mezi tím byla na každou plotnu (ztuhlá směs agaru a LB média) nanесena kapka směsi, která byla tvořena 25 µl ampicilinu, 100 µl IPTG a 20 µl XGALu. Tato směs byla po plotně rozetřena bakteriální kličkou.
5. Poté byla na takto připravenou plotnu rozetřeno 150 – 200 µl narostlých bakterií s plazmidy. Tyto plotny byly následně vloženy do termostatu (37°C) a ponechány v něm přes noc.

Colony PCR:

1. Z každé plotny bylo malou špičkou vypíchnuto 8 kolonií. Každá vypíchnutá kolonie byla přenesena do mikrozukavky s 10 µl vody. Tyto zkumavky byly vloženy do termocykléru, v němž byl spuštěn program LIKV. Tento program zničí buněčné stěny, degraduje DNAázy a uvolní DNA.

| | |
|------|------------|
| 95°C | 5 min |
| 50°C | 1 min 30 s |
| 96°C | 1 min 30 s |
| 45°C | 1 min |
| 96°C | 1 min |
| 40°C | 1 min |
| 15°C | ∞ |

2. Mezi tím byl připraven master mix pro amplifikační PCR

| | |
|------------------------------------|--------|
| Combi PPP Master Mix (Top-Bio, ČR) | 10 µl |
| SP6 (GATTAGGTGACACTATAG) | 0,5 µl |
| T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) | 0,5 µl |

3. Namíchaná směs byla napipetována k 10 µl suspenze degradovaných bakteriálních buněk. Poté byla provedena amplifikace s následujícím předpisem.

| | | |
|-----|------|-------------|
| 1x | 94°C | 4 min |
| 31x | 94°C | 1 min |
| | 50°C | 1 min |
| | 72°C | 4 min |
| 1x | 72°C | 15 – 45 min |

4. Po amplifikaci byla klasicky provedena gelová elektroforéza. Před samotnou sekvenací vzorků byla zjištěna koncentrace DNA pomocí spektrofotometru (NanoDrop ND-1000). Do sekvenační reakce bylo přidáno minimálně 400 ng DNA. Jako primer byl použit 3,2 pmol SP6.

3.3.7. Vyhodnocení a analýza sekvencí

Sekvenační analýza byla provedena laboratoří sekvenace DNA, do níž byly předány příslušné vzorky. Výsledky analýzy (sekvence) byly zpracovány v programu SeqMan, jehož pomocí byly odstraněny sekvence použitých primerů.

Alignment byl vytvořen metodou MAFFT (Kato et al., 2002), který je k volnému použití na serveru <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Předem nastavené parametry zůstaly beze změny, změna byla provedena jen u použitého algoritmu. Pro tyto účely byl vybrán algoritmus G-INS-i. Takto vytvořený alignment byl upravován ručně v programu BioEdit (ořezání začátku a konce sekvencí, odstranění hypervariabilních oblastí). Celkově byly vytvořeny dva datasety (SSU rDNA, ITS1-5.8S rDNA-ITS2). Pro tvorbu těchto datasetů byly využity jak sekvence nově izolovaných druhů, sekvence znovu osekvenované či sekvence dalších publikovaných druhů, které jsou dostupné na GenBank.

Fylogenetické stromy byly konstruovány metodou maximum likelihood (ML) a Bayesovskou metodou. Analýza ML byla provedena v programu RaxML 7.2.6 (Stamakis, 2006) s modelem GTRGAMMAI. Statistická podpora topologie byla odhadnuta pomocí bootstrapové analýzy s 1000 pseudoreplikáty. Bayesovská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist, 2001) s modelem GTR + I + Γ + covarion. Počet generací Monte Carlo Markov Chain byl u obou datasetů $3 \cdot 10^6$. Topologie stromů byla zaznamenávána každou 100. generaci. Burn-in perioda byla stanovena jako prvních 7500 stromů.

4. Výsledky

4.1. Izoláty

Pro účely této diplomové práce byly využity jak zamražené kultury ze sbírek PŘF UK v Praze, tak kultury nově získané. Nové kultury pocházely od Mgr. Pavly Smejkalové, která je izolovala především z domácích zvířat (ovce domácí, koza domácí). Starší kultury byly poskytnuty RNDr. Ivanem Čepičkou Ph.D., z jehož prací tato diplomová práce vychází a na které navazuje.

Konkrétně byly izolovány čtyři nové kultury (KOZA2, OVCE4, OVCE5, OVCE6). Tyto izoláty pocházejí od Mgr. Pavly Smejkalové. Zbylé dva nové izoláty (PDOU7N a HER5) byly objeveny v kulturách starších. Izolát PDOU7N byl objeven opětovnou sekvenací SSU rDNA původního izolátu PD-OU7, který byl použit již v dřívějších výzkumech (např. Cepicka et al., 2006). Resekvenováno bylo více izolátů (viz dále) a téměř u všech se potvrdily předchozí výsledky. Výjimku tvořil tento vzorek, který byl původně zařazen do linie 6. Na základě naší opětovné sekvenace byl však přeřazen do linie 3. Izolát HER5 byl původně použit pro účely jiné práce, protože kromě tetratrichomonád obsahoval i zástupce rodu *Honigbergiella* (Hampl et al. 2004, 2007).

V následující tabulce (tabulka č. 2) jsou vypsané nově získané izoláty spolu se zařazením do příslušné linie.

| název | linie |
|--------|------------|
| OVCE4 | Nová linie |
| OVCE5 | Nová linie |
| OVCE6 | Nová linie |
| KOZA2 | Skupina B |
| PDOU7N | Linie 3 |
| HER5 | Linie 2 |

Tabulka č. 2

4.2. Kontrolně osekvenované starší izoláty

Celkem bylo resekvenováno 19 izolátů. Ne všechny izoláty byly však pro tuto diplomovou práci relevantní (ne všechny nakonec obsahovaly zástupce rodu *Tetratrichomonas*), proto zde budou uváděny jen ty, které byly pro účely této diplomové práce nakonec využity. V následující tabulce č. 3 jsou vypsány vybrané izoláty spolu se zařazením do příslušné linie.

| název | hostitel | linie |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------|
| IVB1 | <i>Bison bison</i> | Linie 1 či 2 |
| IVB5 | <i>Bison bison</i> | Linie 1 či 2 |
| BUVK | <i>Synceru caffer caffer</i> | Linie 1 |
| MANG | <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> | Linie 3 |
| PD-OU7 (resp. PDOU7N) | <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> | Linie 3 |
| PD-OU3 | <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> | Linie 7 |
| PD-OU8 | <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> | Linie 7 |
| PD-OU9 | <i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> | Linie 7 |
| PD22D | <i>Sus scrofa</i> | Linie 7 |
| ZUBR | <i>Bison bonasus</i> | Linie 11 |
| AF | <i>Anas formosa</i> | Linie 15 |
| TGR9 | | Linie 15 |
| KRA-1 | | Linie 15 |

Tabulka č. 3

V mnoha případech nešlo o monoeukaryotické kultury. Velmi často se v kulturách spolu s tetratrichomonádami vyskytovali zástupci rodů *Retortamonas*, *Blastocystis*, *Endolimax*, *Trichomitus* a *Honigbergiella*.

4.3. Fylogenetická analýza

4.3.1. Analýza SSU rDNA sekvencí

Ze všech výše jmenovaných izolátů, ať už nových či resekvenovaných, se podařilo získat sekvenci SSU rDNA. Spolu s těmito sekvencemi byly pro tuto analýzu použity sekvence dalších zástupců z databáze GenBank. Celkem bylo pro tuto analýzu použito 67 OTU. Fylogenetické stromy byly konstruovány metodou maximum likelihood a Bayesovskou metodou.

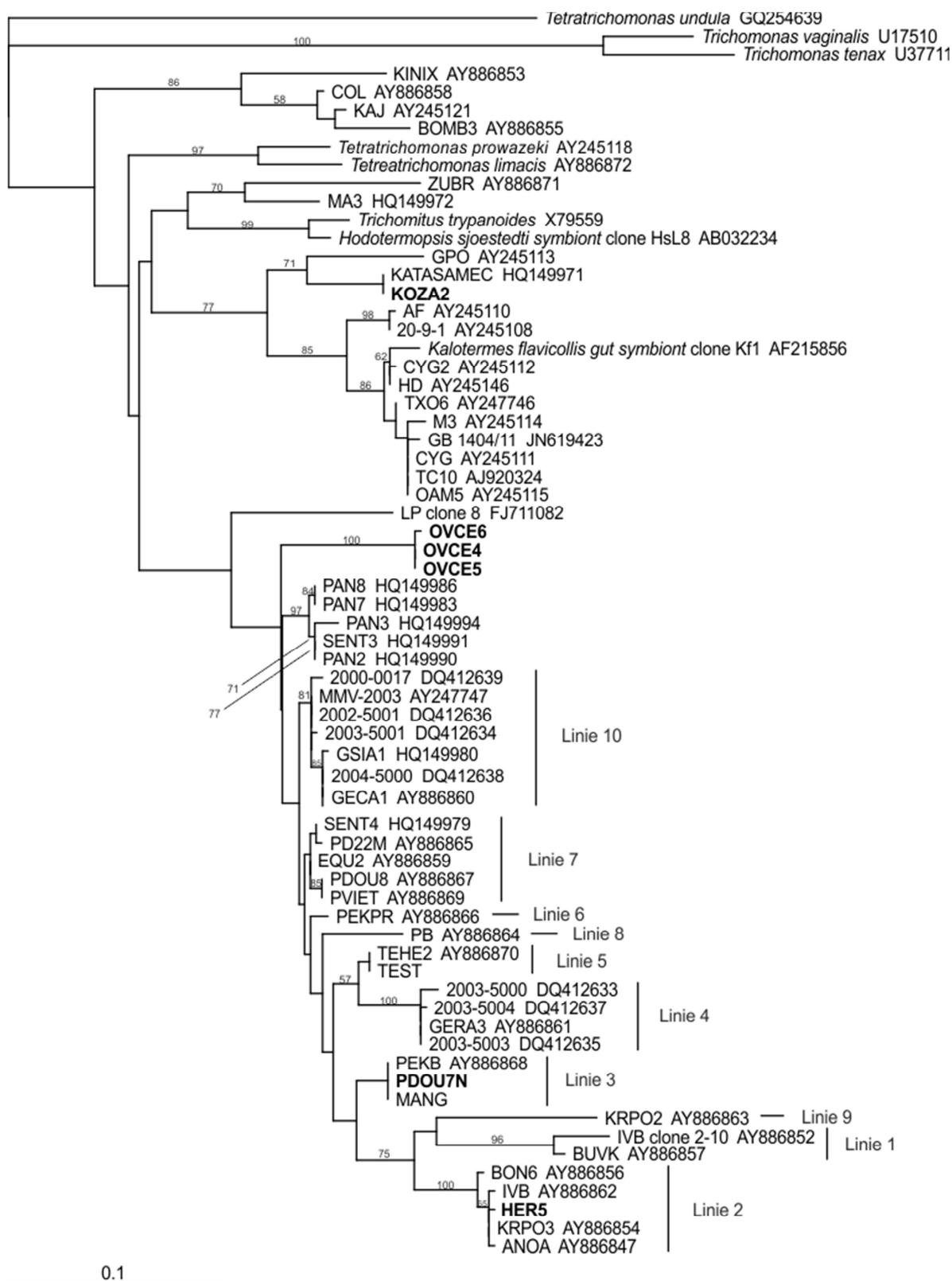
Na obr. 6 je fylogenetický strom sestavený ze sekvencí SSU rDNA. Na základě těchto sekvencí byly sestaveny dva různé stromy, protože pozice linie OVCE (OVCE4, OVCE5 a OVCE6) a LP se jevily jako velmi nestabilní v závislosti na předchozích úpravách jejich sekvencí. Sekvence těchto izolátů totiž obsahovaly inserce, jejichž vystřížením se radikálně změnila pozice izolátů uvnitř fylogenetického stromu. Inserce jsou typické pro celou skupinu A, nicméně jen u těchto dvou izolátů se tak radikálně změnila pozice v závislosti na jejich vystřížení. Obr. 6 tedy ukazuje fylogenetický strom bez inzercí.

Ze stromu na obr. 6 je jasné patrné, že linie 1 – 10, linie LP, nová linie ovcí a tzv. novel lineage 2 (Smejkalová et al., 2012), tzn. skupina A rodu *Tetratrichomonas*, tvoří monofyletickou skupinu. Bohužel toto tvrzení zde není dobře statisticky podpořeno. Bazální linie celé skupiny A je tvořena linií LP. Všechny nově osekvenované izoláty z ovcí (OVCE4, OVCE5, OVCE6) zde tvoří samostatnou linii, která se poměrně brzy odděluje od zbývajících linií. Další z nově izolovaných izolátů, HER5 byl zařazen do již existující linie 2, izolát PDOU7N pak nově do linie 3. Velmi dobrou statistickou podporu má v tomto stromě „cluster“ linií 1, 2 a 9, což podporuje předchozí analýzy (Cepicka et al., 2006; Smejkalová et al., 2012). Dobře statisticky podpořen je i „cluster“ linií 4 a 5, který se rovněž objevil ve zmiňovaných pracích.

Linie 3, ve které je obsažen i náš nově osekvenovaný izolát PDOU7N, je v této analýze sesterská ke clusteru linií 1, 2 a 9, bohužel již bez výrazné statistické podpory. Špatně podpořená je blízká pozice linií 6 a 7. Tzv. novel lineage 2, která je zde reprezentována izoláty PAN2, PAN3, PAN7, PAN8, SENT3, a která byla publikována v článku Smejkalová et al., 2012, opět potvrzuje své postavení jako blízké příbuzné linii 10.

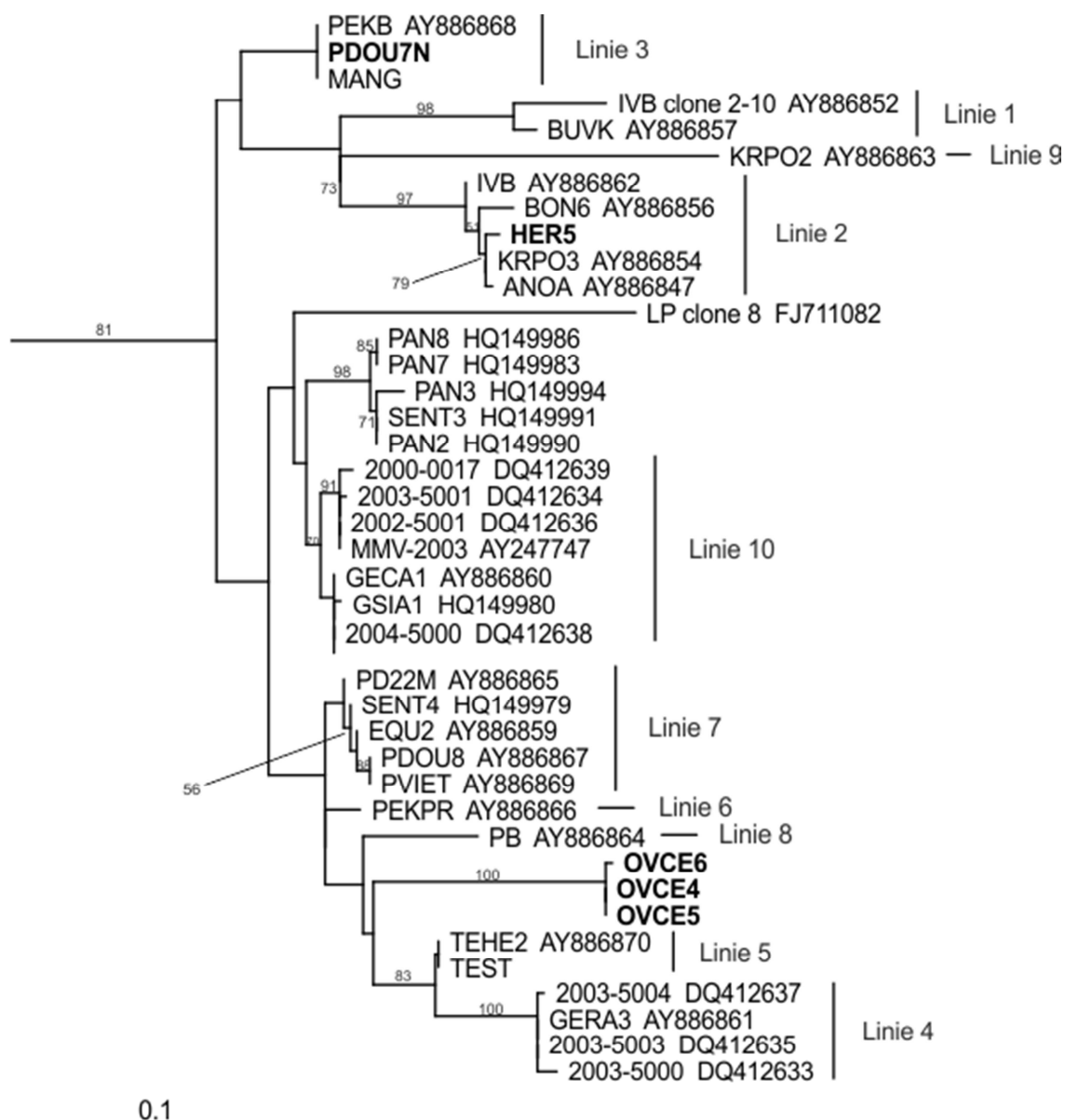
Poslední z nově osekvenovaných izolátů, KOZA2 (morfolgie obr. 18), je součástí skupiny B rodu *Tetratrichomonas*. V našich analýzách je řazena k linii 15, tzn. do komplexu

Tetratrichomonas gallinarum. Celá skupina B je v této analýze parafyletická s druhy *Tetratrichomonas prowazeki* a *Trichomitus trypanoides* jako vnitřními větvemi této skupiny.



Obr. 6: Fylogenetický strom sestavený na základě sekvencí SSU rDNA (bez inzercí). Strom byl konstruován metodou maximum likelihood. Čísla u příslušných větví znamenají hodnotu bootstrapu z analýzy ML (Bayesovská analýza). Strom není zakořeněn. Nově osekvenované izoláty jsou tučně zvýrazněny.

Pokud byly při úpravě sekvencí výše zmiňovaných izolátů dané inserce ponechány, pozice uvnitř skupiny A se změnily. Z důvodu změny pouze uvnitř skupiny A je následující strom (obr. 7) jen výřezem dané skupiny, protože ostatní pozice zůstaly nezměněny.



Obr. 7: Fylogenetický strom sestrojený na základě sekvencí SSU rDNA (s insercemi) – výřez. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood. Čísla u příslušných větví znamenají hodnotu bootstrapu z analýzy ML (Bayesovská analýza). Strom není zakořeněn. Nově osekvenované izoláty jsou tučně zvýrazněny.

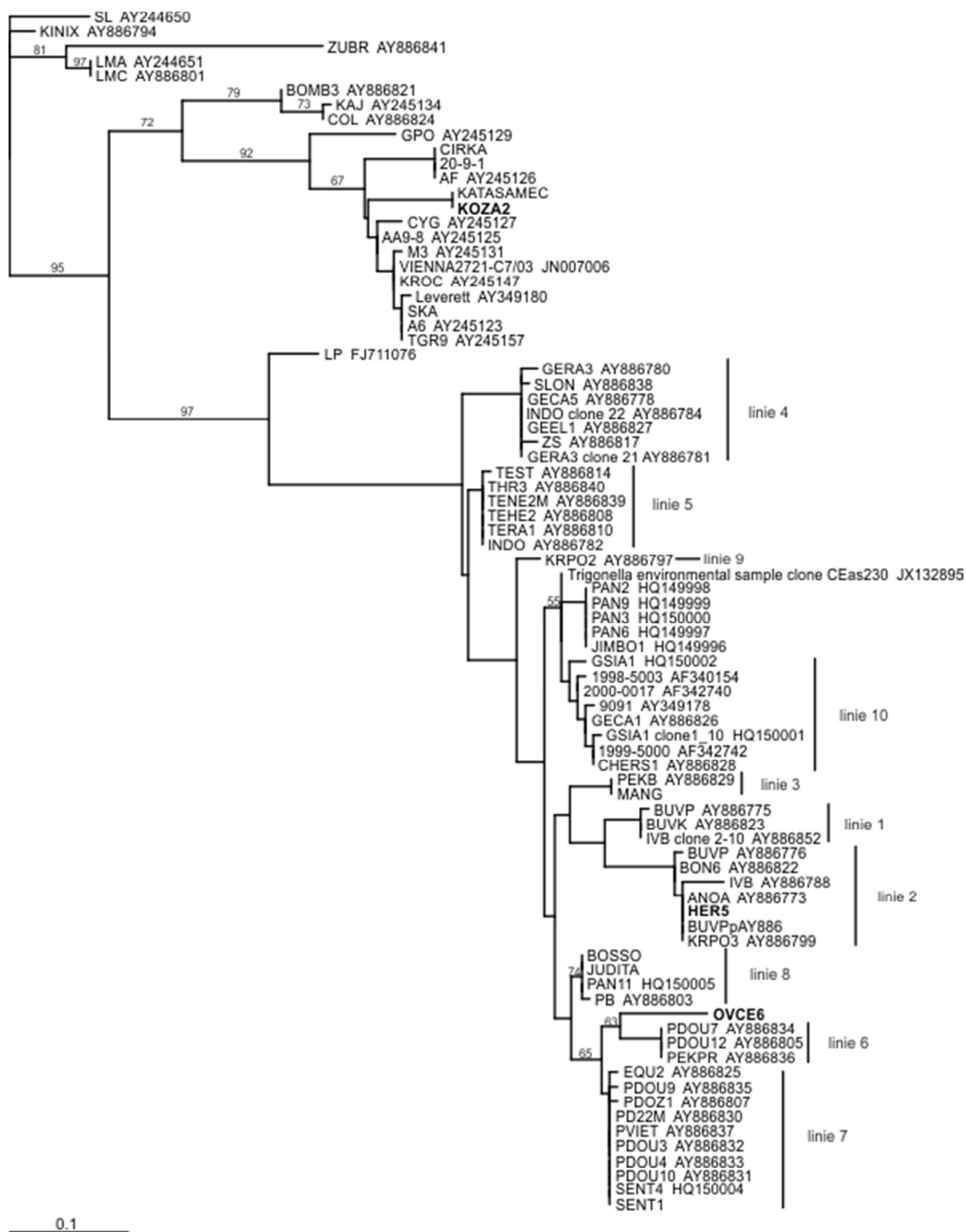
V tomto stromu (obr. 7) je jasně patrná změna pozice linie LP, která v předchozím stromě tvořila bazální linii ke všem zbývajícím liniím. Nyní je její pozice bližší liniím 10 a již zmiňované novel lineage 2, které jsou i zde velmi blízce příbuzné. Pozice „ovčí“ linie, která se v předchozím stromě poměrně brzy oddělovala od zbývajících linií, je taktéž zcela odlišná. Tvoří zde linii blízce příbuznou liniím 4 a 5, jejichž blízká příbuznost byla v tomto stromě opět

potvrzena. Linie 6 a 7 i zde svým blízkým postavením větví potvrzují předchozí výzkumy. Linie 1, 2 a 9 zde tak jako v předchozím stromě tvoří cluster, jemuž je sesterská linie 3.

4.3.2. Analýza sekvencí regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2

Na obr. 8 je fylogenetický strom sestavený na základě analýzy sekvencí regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Pro účely sestavení tohoto stromu bylo použito celkem 82 OTU. ITS region pro tuto analýzu byl nově izolován ze vzorků KOZA2, OVCE6 a HER5.

Izolát KOZA2 byl opět zařazen do skupiny B. Tentokrát je velmi dobře statisticky podpořena monofylie celé skupiny A. Linie LP opět tvoří bazální linii skupiny A. Izolát OVCE6 opět tvoří samostatnou linii v rámci skupiny A, tentokrát sesterskou k linii 6. Linie 6 a 7 jsou si znovu velmi blízce příbuzné. Linie 8 je pak sesterská k oběma liniím 6 a 7. Pozice linií 1 a 2 je velmi blízká, sesterskou pozici k nim pak zaujímá linie 3. K linii 10 je znovu nejbližší tzv. novel lineage 2. Linie 4 a 5 mají navzájem konstantní pozice napříč všemi analýzami.



Obr. 8: Fylogenetický strom sestavený na základě sekvencí regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood. Čísla u příslušných větví znamenají hodnotu bootstrapu z analýzy ML (Bayesovská analýza). Strom není zakořeněn. Nově osekvenované izoláty jsou tučně zvýrazněny.

4.4. Morfologická analýza

Pro účely morfologické analýzy byly příslušné izoláty barveny protargolem. V této diplomové práci byly využity jak preparáty nabarvené již dříve (k dispozici ve sbírkách PŘF UK) tak preparáty nově obarvené. Nově nabarveny byly samozřejmě nově izolované kultury, tzn. KOZA2, OVCE4, OVCE5, OVCE6, PDOU7N. Izoláty HER5 byly nabarveny již dříve, jelikož byly původně využity pro účely jiného výzkumu. Kromě zcela nových kultur byly přebarveny i některé stávající, které byly znovu kultivovány (IVB1, IVB5, BUVK). Izoláty IVB1 a IVB5 tvořily původně jeden společný izolát IVB. Po opětovné kultivaci bylo zjištěno, že cca 100. pasáž a cca 500. pasáž jedné kultury se vzájemně liší, proto byly pro další použití rozděleny na dva odlišné izoláty IVB1 (100. pasáž), IVB5 (500. pasáž). Pro účely této analýzy bylo potřeba mít z každé linie skupiny A preparáty alespoň dvou příslušných izolátů.

V tabulce č. 4 je přehled použitých izolátů pro potřeby morfologické analýzy spolu s jejich zařazením k příslušné linii.

| Linie | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 8 | 10 | ovce |
|-------|------|------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| název | BUVK | IVB | MANG | GECA5 | TENE2M | PD22D | BOSSO | 34-1 | OVCE4 |
| | IVB1 | IVB | PDOU7N | GERA3 | THR3 | PDOU8 | JUDITA | GECA1 | OVCE5 |
| | | HER5 | | ZS | | SENT1 | | GEPA2 | OVCE6 |
| | | | | | | | | GSIA1 | |
| | | | | | | | | CHERS3 | |

Tabulka 4

4.4.1. Měření buněk

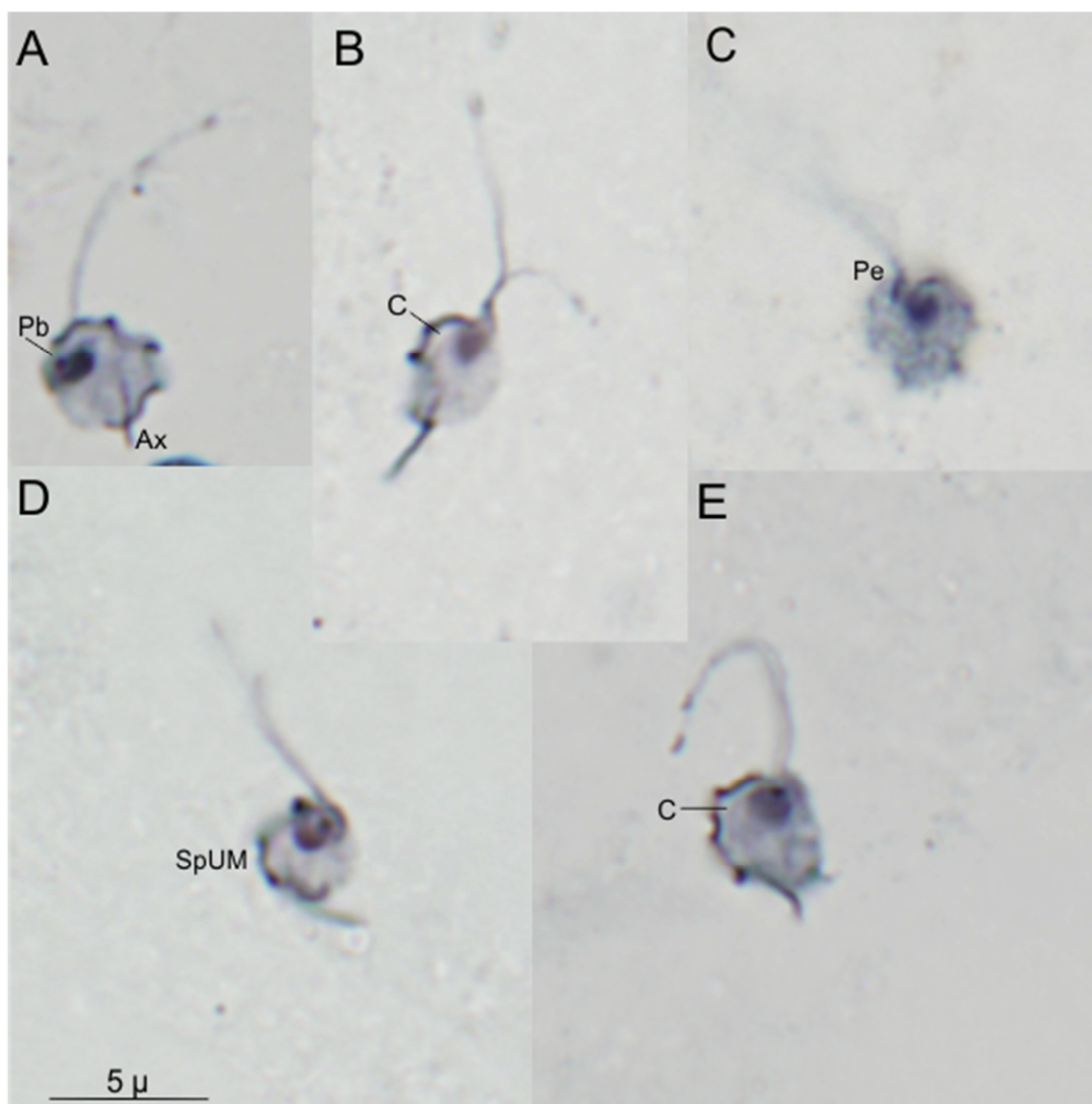
Pro potřebu morfologické analýzy bylo provedeno měření barvených buněk jednotlivých preparátů. Měření bylo provedeno u 30 buněk od každého izolátu z jednotlivých linií. Počty bičíků byly spočítány u 50 buněk z každého izolátu. Následuje tabulka (tabulka č. 5) příslušného měření. U preparátu OVCE4,5 byly dohromady změřeny oba izoláty OVCE4 a OVCE5, neboť se zjistilo, že šlo o identické druhy.

| linie | název | Délka (μm) | Šířka (μm) | Volný konec axostylu (μm) | Počet bičíků: 4/3/2 |
|-------|----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| 1 | BUVK | 4.0 ± 0.4 (4.6 - 3.2) | 3.6 ± 0.3 (4.2 - 3.0) | 1.3 ± 0.4 (0.5 - 1.8) | 0/9/41 |
| | IVB1 | 3.7 ± 0.4 (3.2 - 4.3) | 3.3 ± 0.4 (2.6 - 3.9) | 2.0 ± 0.4 (1.4 - 2.6) | 0/3/47 |
| 2 | IVB5 | 4.5 ± 0.5 (3.8 - 5.5) | 3.8 ± 0.5 (2.8 - 5.0) | 2.0 ± 0.6 (1.3 - 3.9) | 0/22/27 |
| | HER5 | 3.8 ± 0.3 (3.1 - 4.5) | 3.0 ± 0.3 (2.5 - 3.8) | 1.6 ± 0.6 (0.8 - 3.4) | 0/3/47 |
| 3 | MANG | 4.8 ± 0.7 (3.2 - 5.9) | 3.7 ± 0.5 (2.7 - 4.8) | 1.6 ± 0.6 (0.6 - 3.2) | 14/33/3 |
| | PDOU7N | 5.2 ± 0.5 (4.1 - 6.4) | 3.9 ± 0.5 (2.9 - 4.7) | 2.8 ± 0.8 (1.5 - 4.2) | 0/27/23 |
| 4 | GECA5 | 7.1 ± 0.7 (5.9 - 8.3) | 5.8 ± 0.6 (4.3 - 6.6) | 3.1 ± 0.7 (2.1 - 4.7) | 35/15/0 |
| | GERA3 | 6.8 ± 0.6 (5.9 - 8.0) | 5.6 ± 0.6 (4.3 - 6.5) | 2.6 ± 0.6 (1.3 - 3.8) | 4/46/0 |
| | ZS | 7.2 ± 0.9 (5.7 - 9.6) | 5.3 ± 0.8 (3.8 - 6.8) | 4.1 ± 1.1 (2.3 - 6.4) | 38/12/0 |
| 5 | TENE2M | 7.9 ± 0.9 (5.9 - 9.6) | 5.4 ± 0.7 (4.3 - 6.9) | 4.0 ± 0.9 (3.0 - 6.5) | 14/36/0 |
| | THR3 | 6.3 ± 0.6 (5.2 - 7.4) | 5.4 ± 0.7 (4.3 - 7.4) | 3.6 ± 0.9 (1.8 - 5.3) | nelze určit |
| 7 | PD22D | 5.4 ± 0.8 (4.0 - 7.3) | 4.6 ± 0.5 (3.6 - 5.7) | 2.5 ± 0.7 (1.1 - 3.8) | 0/10/40 |
| | PD-OU8 | 7.1 ± 1.0 (5.5 - 9.0) | 5.4 ± 0.7 (4.1 - 7.0) | 2.1 ± 0.7 (0.8 - 4.2) | 7/43/0 |
| | SENT1 | 6.2 ± 0.7 (5.0 - 7.8) | 4.9 ± 0.5 (4.0 - 6.0) | 1.8 ± 0.6 (0.9 - 2.8) | 3/47/0 |
| | (SHINDA) | 5.4 ± 0.6 (4.5 - 6.9) | 4.4 ± 0.5 (3.8 - 5.6) | 1.9 ± 0.5 (1.2 - 2.8) | 1/46/3 |
| 8 | BOSSO | 4.3 ± 0.5 (3.1 - 5.6) | 3.6 ± 0.4 (2.7 - 4.4) | 1.4 ± 0.4 (0.9 - 2.3) | 0/9/2 |
| | JUDITA | 4.5 ± 0.4 (3.8 - 5.4) | 3.7 ± 0.4 (3.0 - 4.8) | 1.7 ± 0.3 (1.2 - 2.2) | 3/37/10 |
| 10 | 34-1 | 6.6 ± 0.7 (5.1 - 8.2) | 5.4 ± 0.7 (3.9 - 7.2) | 2.0 ± 0.5 (1.0 - 3.1) | 13/37/0 |
| | GEPA2 | 5.7 ± 0.7 (4.3 - 6.9) | 4.9 ± 0.4 (4.2 - 5.7) | 2.6 ± 0.7 (1.6 - 4.1) | 4/7/1, |
| | CHERS3 | 6.2 ± 0.7 (5.0 - 7.4) | 5.6 ± 0.8 (3.9 - 7.1) | 2.6 ± 0.7 (1.5 - 4.4) | 4/56/0 |
| | GSIA1 | 6.6 ± 0.7 (5.0 - 8.3) | 5.2 ± 0.5 (4.3 - 6.1) | 1.7 ± 0.4 (1.1 - 2.8) | 34/14/2 |
| Ovce | OVCE | 6.3 ± 0.9 (5.0 - 8.8) | 5.5 ± 0.7 (4.5 - 7.3) | 2.1 ± 0.6 (1.1 - 3.7) | 4/44/2 |
| | OVCE4,5 | 5.8 ± 0.7 (4.7 - 6.9) | 5.2 ± 0.7 (4.1 - 6.5) | 2.0 ± 0.7 (0.9 - 3.1) | 3/44/3 |

Tabulka č. 5

4.4.2. Morfologie linie 1

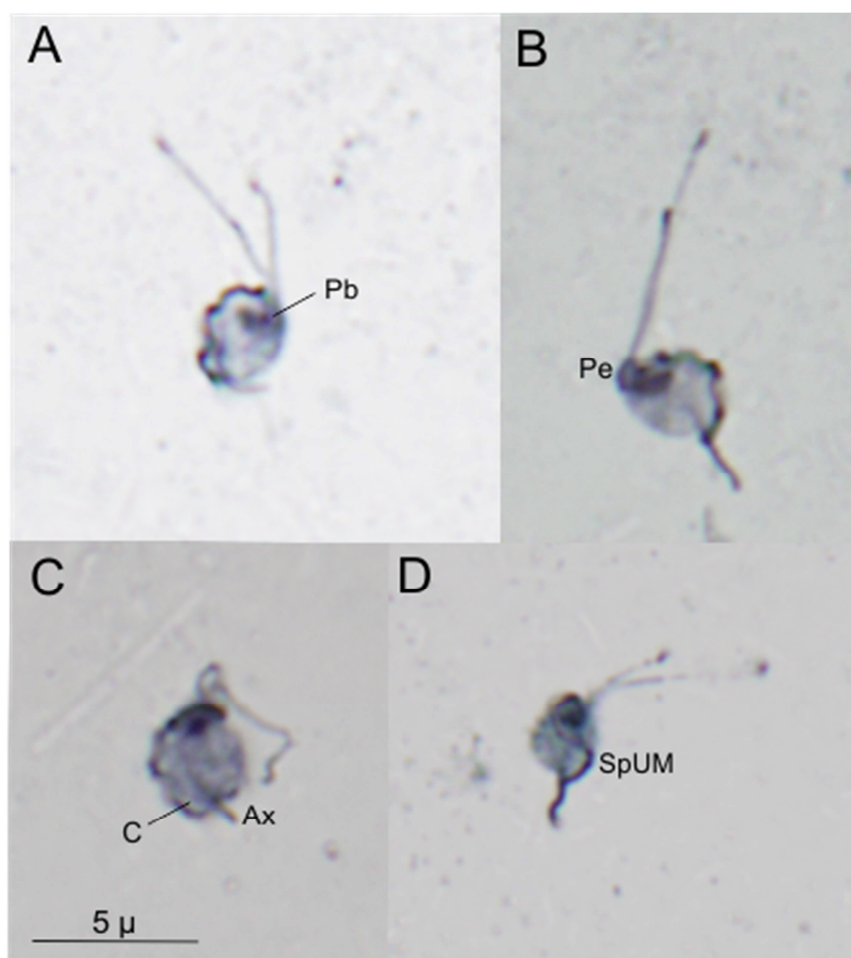
Zástupci linie 1 (obr. 9) byli po morfologické stránce výrazně odlišní od všech ostatních linií, s výjimkou linie 2, se kterou si byli podobní jak morfologicky, tak fylogeneticky. Počet předních bičíků byl u naprosté většiny sledovaných buněk dva, nicméně našly se i zástupci s třemi předními bičíky. Průměrná délka těla buňky byla nejmenší z ostatních sledovaných linií. Tvar těla byl poměrně kulatý a undulující membrána se spirálně stáčela kolem těla buňky. Parabasální aparát byl malý, kosta slabá a pelta nepříliš vysoká. Délka vyčnívající části axostylu byla poměrně krátká.



Obr. 9: Fotografie izolátů linie 1. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, SpUM – spirální undulující membrána.

4.4.3. Morfologie linie 2

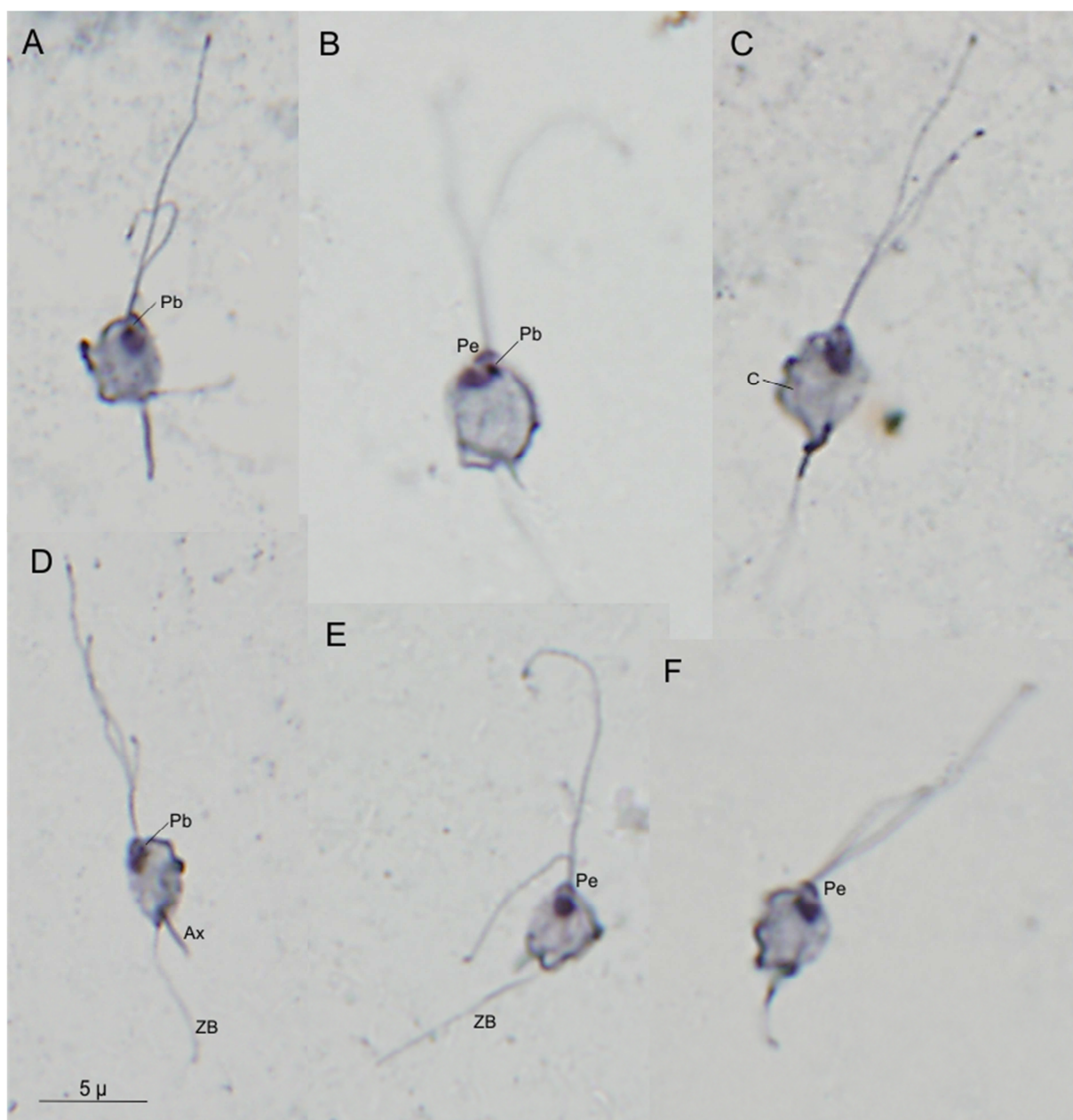
Zástupci linie 2 (obr. 10) byli morfologicky prakticky totožní se zástupci linie 1. Tělo bylo malé (spolu s linií 1 měli buňky nejmenší naměřené délky), kulatější. Undulující membrána se spirálně stáčela kolem těla buňky. Převládající počet předních bičíků byl dva. Parabasální aparát byl malý, kosta velmi slabá. Pozorování pelyt značně ztěžovala spirální undulující membrána, nicméně pelta se zdála nepříliš vysoká. Část axostylu vyčnívající z těla buňky byla krátká.



Obr. 10: Fotografie izolátů linie 2. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, SpUM – spirální undulující membrána.

4.4.4. Morfologie linie 3

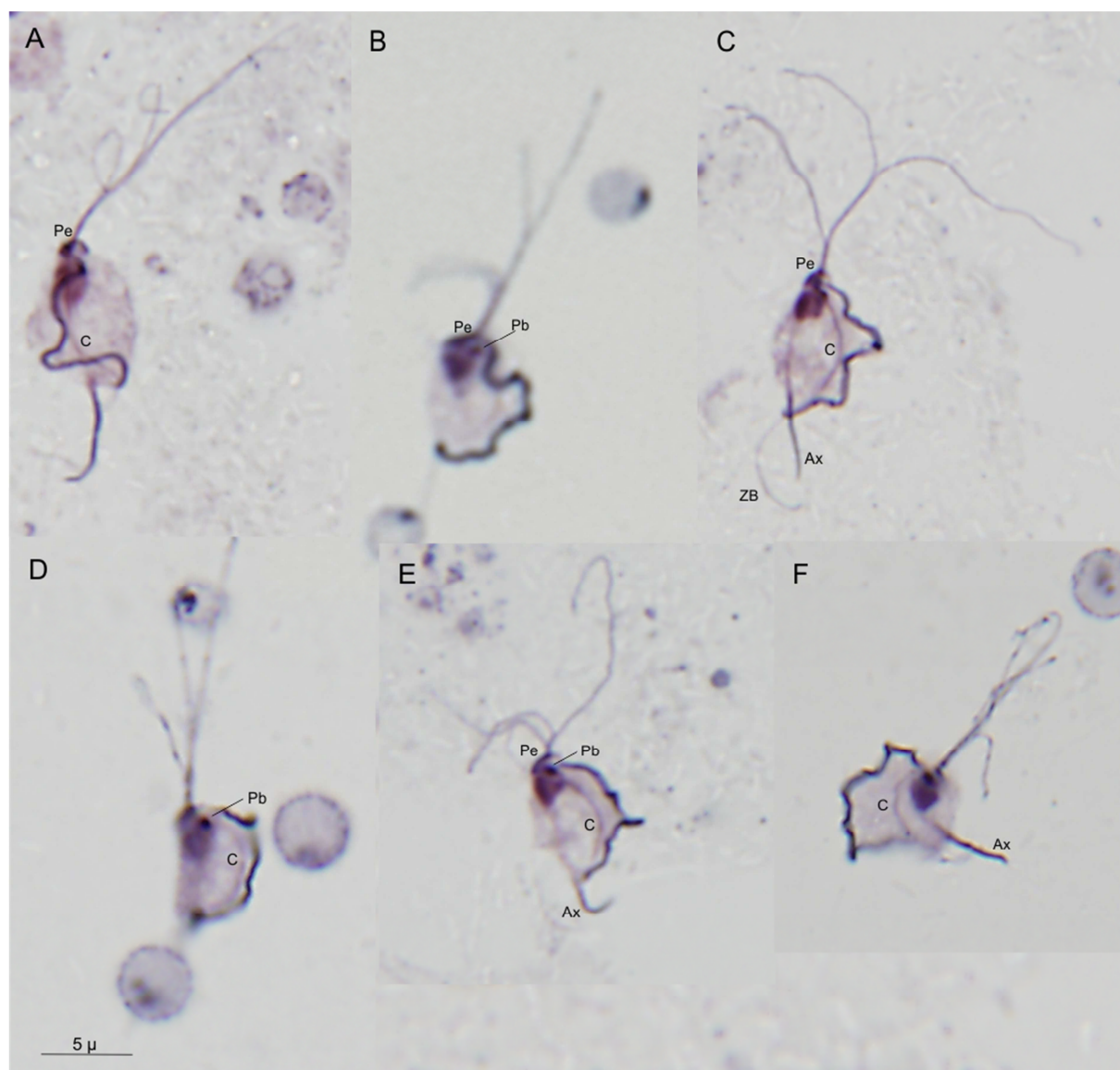
Buňky z linie 3 (obr. 11) měly oválný tvar těla. Délka byla o něco větší než u linií 1 a 2, v průměru dosahovaly délky 5 μm . U pozorovaných buněk převažovaly tři přední bičíky. Volný konec zpětného bičíku byl nápadně dlouhý. Parabasální aparát byl větší, pelta dobře patrná, vyšší. Délka vyčnívající části axostylu nebyla nijak výrazná.



Obr. 11: Fotografie izolátů linie 3. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.5. Morfologie linie 4

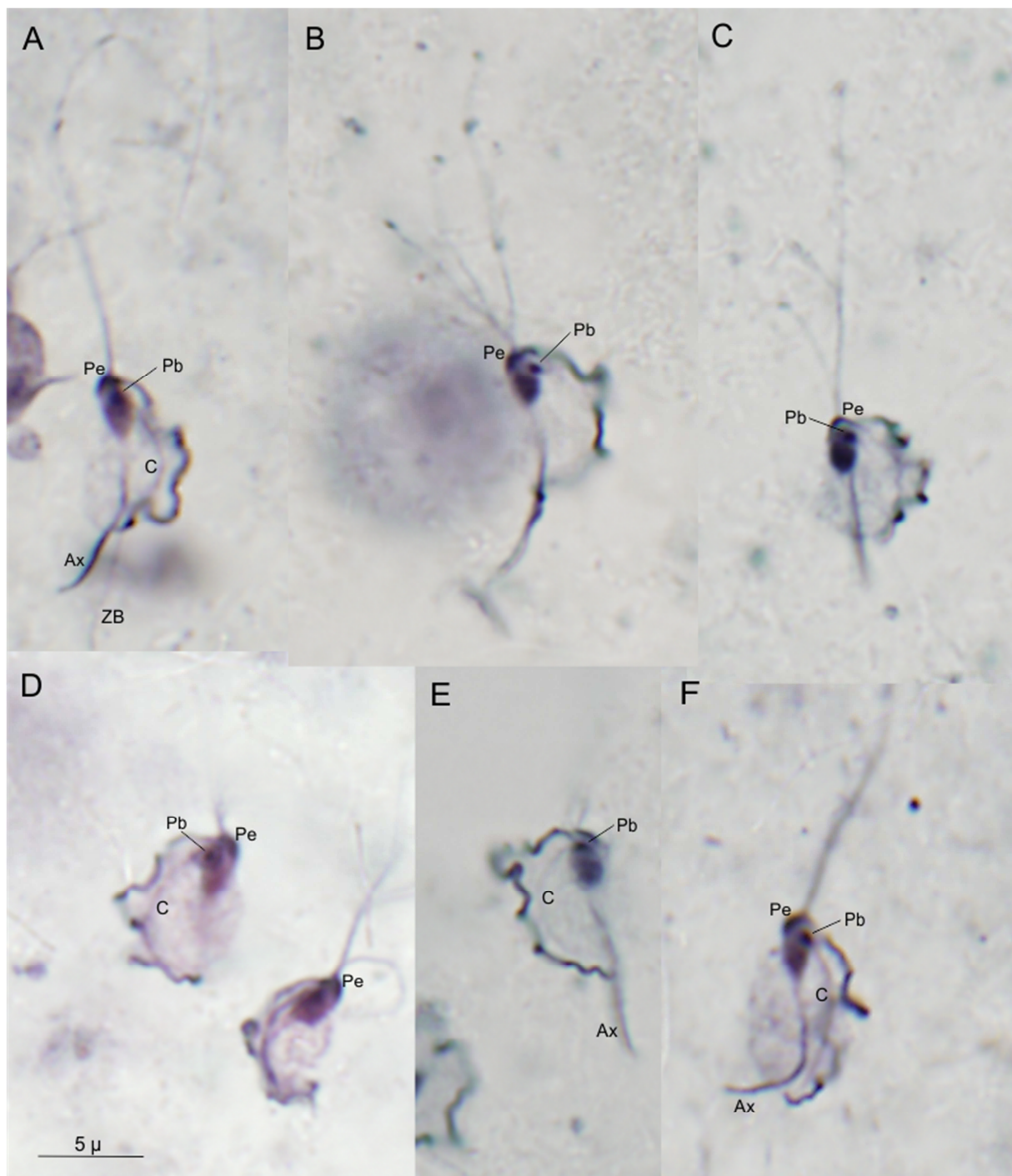
Naměřené délky těla buněk z linie 4 (obr. 12) byly spolu s buňkami z linie 5 (obr. 13) prakticky největší. V průměru dosahovaly až 7 μm . Tvar těla byl protáhlý. Počty předních bičíků nebyly zcela jednoznačné. U jednoho z izolátů (GERA3) převažovaly formy se třemi předními bičíky, u zbylých izolátů pak bylo pozorováno více buněk se čtyřmi předními bičíky. Parabasální aparát byl jeden z největších (spolu s linií 5). Kosta byla dobře patrná, silnější. Pelta nápadná, vyšší. Volná část zpětného bičíku nebyla příliš dlouhá. Undulující membrána byla vysoká s nápadnými většími vlnami.



Obr. 12: Fotografie izolátů linie 4. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.6. Morfologie linie 5

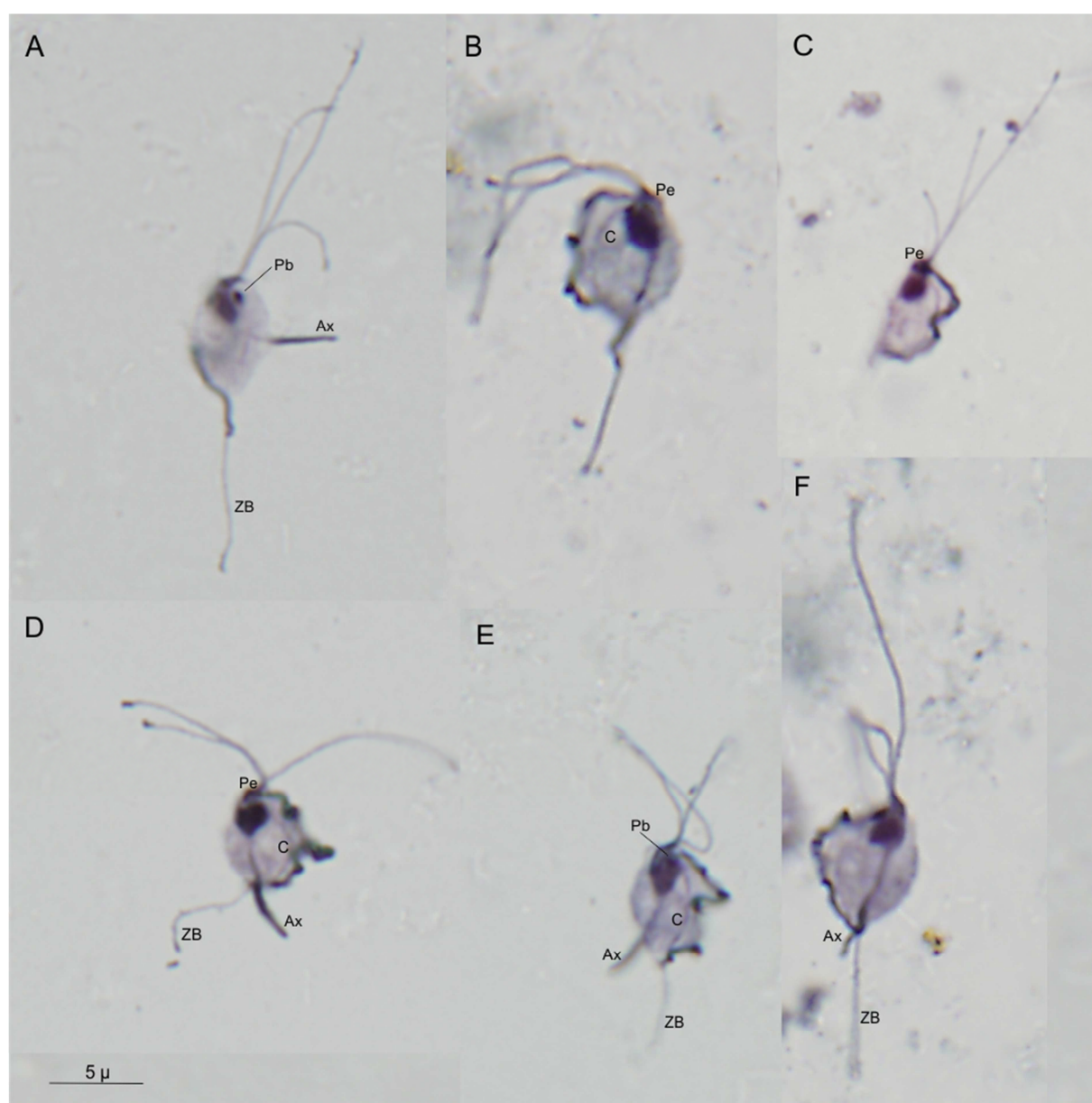
Zástupci linie 5 (obr. 13) byli prakticky totožní se zástupci linie 4. Naměřená délka buněk byla největší ze zbývajících linií. Tvar těla byl protáhlý. Počet předních bičíků není zcela jasný. U jednoho (TENE2M) z celkem dvou vzorků převažovali zástupci se třemi předními bičíky, nicméně počet forem se čtyřmi předními bičíky také nebyl zcela zanedbatelný. U druhého ze vzorků (THR3) počty předních bičíků nešlo pozorovat z důvodu nedostatečného obarvení. Parabasální aparát byl veliký (prakticky největší z pozorovaných), kosta dobře patrná, silnější. Pelta byla nápadná, vyšší. Undulující membrána byla vyšší s většími vlnami.



Obr. 13: Fotografie izolátů linie 5. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.7. Morfologie linie 7

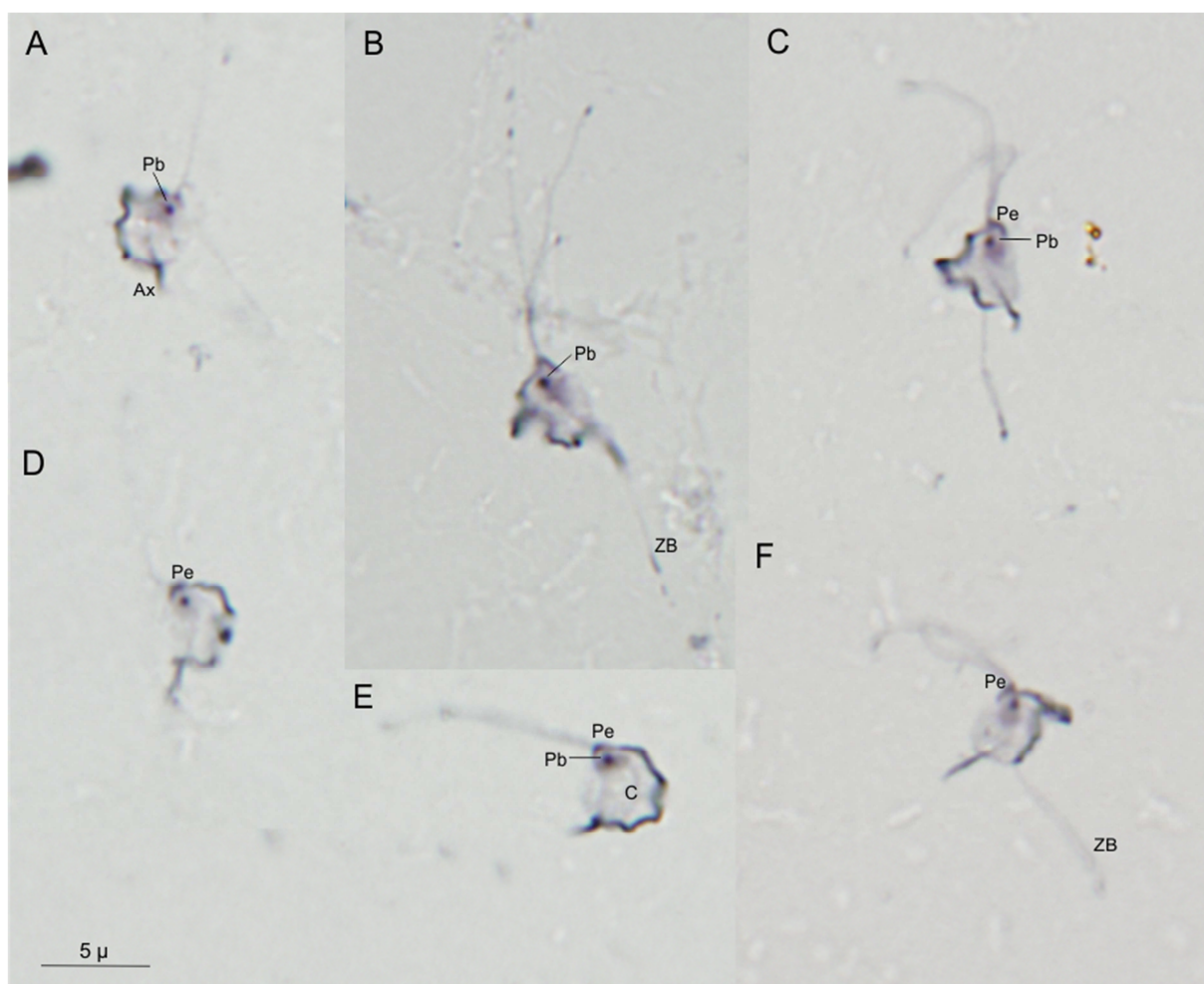
Délka těla zástupců z linie 7 (obr. 14) byla větší, nicméně nedosahovala takových velikostí jako předchozí dvě linie (linie 4 a 5). Tvar těla byl oválný. Počet předních bičíků byl tři, v jednom z izolátů (PD22D) však tento počet neodpovídal a s výraznou převahou se zde objevovaly buňky se dvěma předními bičíky. Tento izolát byl také odlišný svou délkou, která byla výrazně kratší než u zbývajících izolátů z příslušné linie. Parabasální aparát byl vzhledem k velikosti těla spíše větší. Kosta byla dobře patrná, nicméně slabší. Unulující membrána byla nižší s větším počtem menších vln. Pelta byla poměrně nízká. Volná část zpětného bičíku zhruba odpovídala celkové délce těla.



Obr. 14: Fotografie izolátů linie 7. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.8. Morfologie linie 8

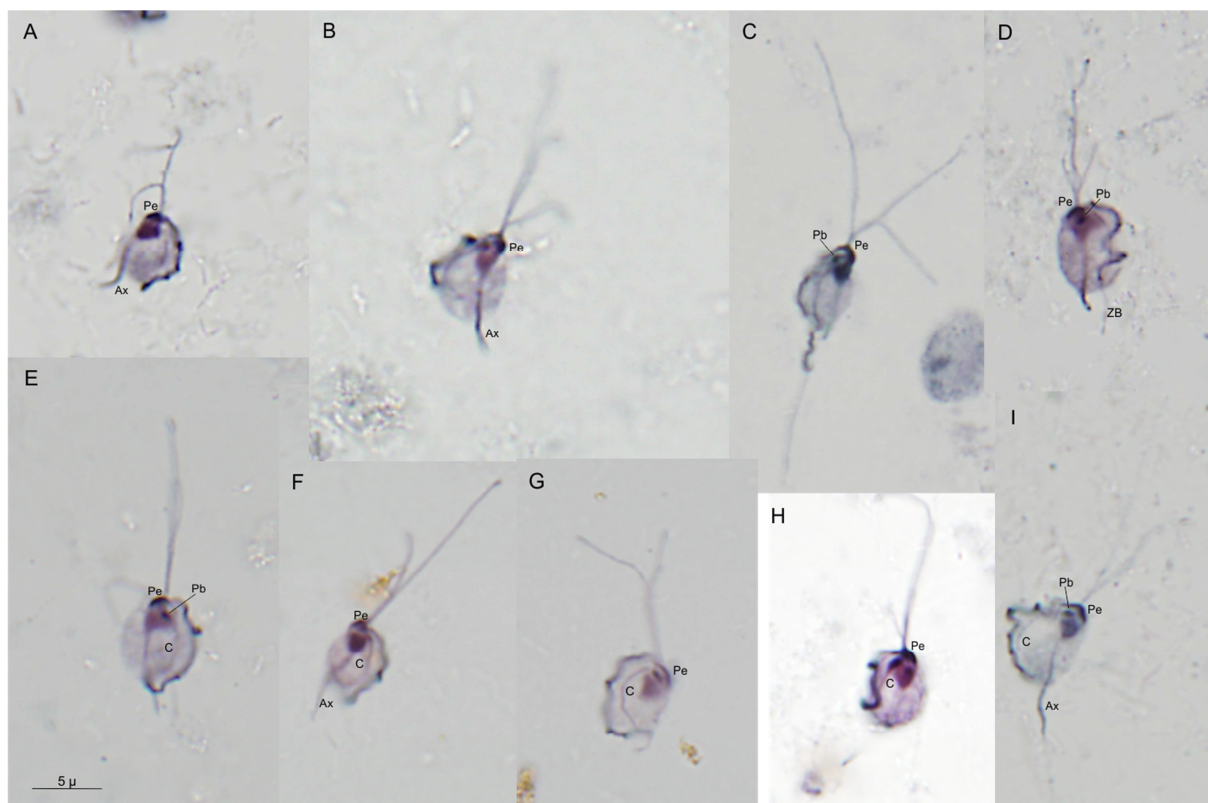
Pozorované buňky z linie 8 (obr. 15) svou délkou těla připomínaly zástupce z linie 1 či 2, byly jen o něco málo delší. Tvar těla však nebyl tak kulatý, jako tomu bylo u linie 1 a 2. Odlišný byl také počet předních bičíků. V tomto případě převažovaly tři přední bičíky, nicméně tento počet byl opět zcela prokazatelný jen u jednoho (JUDITA) ze dvou sledovaných izolátů (u izolátu BOSSO nebylo možné dost dobře pozorovat přední bičíky, nicméně z 11 buněk jich tři přední bičíky mělo devět). Parabasální aparát byl poměrně výrazný a větší. Pelta byla nápadnější a vyšší než u linie 1 a 2. Kosta byla poměrně slabá. Výrazný byl volný konec zpětného bičíku, který byl cca 2 krát delší než tělo buňky.



Obr. 15: Fotografie izolátů linie 8. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.9. Morfologie linie 10

Zástupci linie 10 (obr. 16) patřili se svou délkou těla mezi spíše větší jedince. Tvar těla byl oválný. Přední bičíky byly u většiny buněk tři, nicméně u jednoho izolátu (GSIA1) se vyskytla výjimka a většina buněk tohoto izolátu měla čtyři přední bičíky. Parabasální aparát byl středně veliký, spíše oválný. Pelta byla velmi výrazná a hodně vysoká. Kosta byla velmi dobře pozorovatelná a v podstatě nejsilnější ze všech pozorovaných linií. Undulující membrána byla vyšší s menším počtem větších vln. Volný konec zpětného bičíku nebyl příliš dlouhý, dosahoval délky zhruba odpovídající délce celého těla buňky.

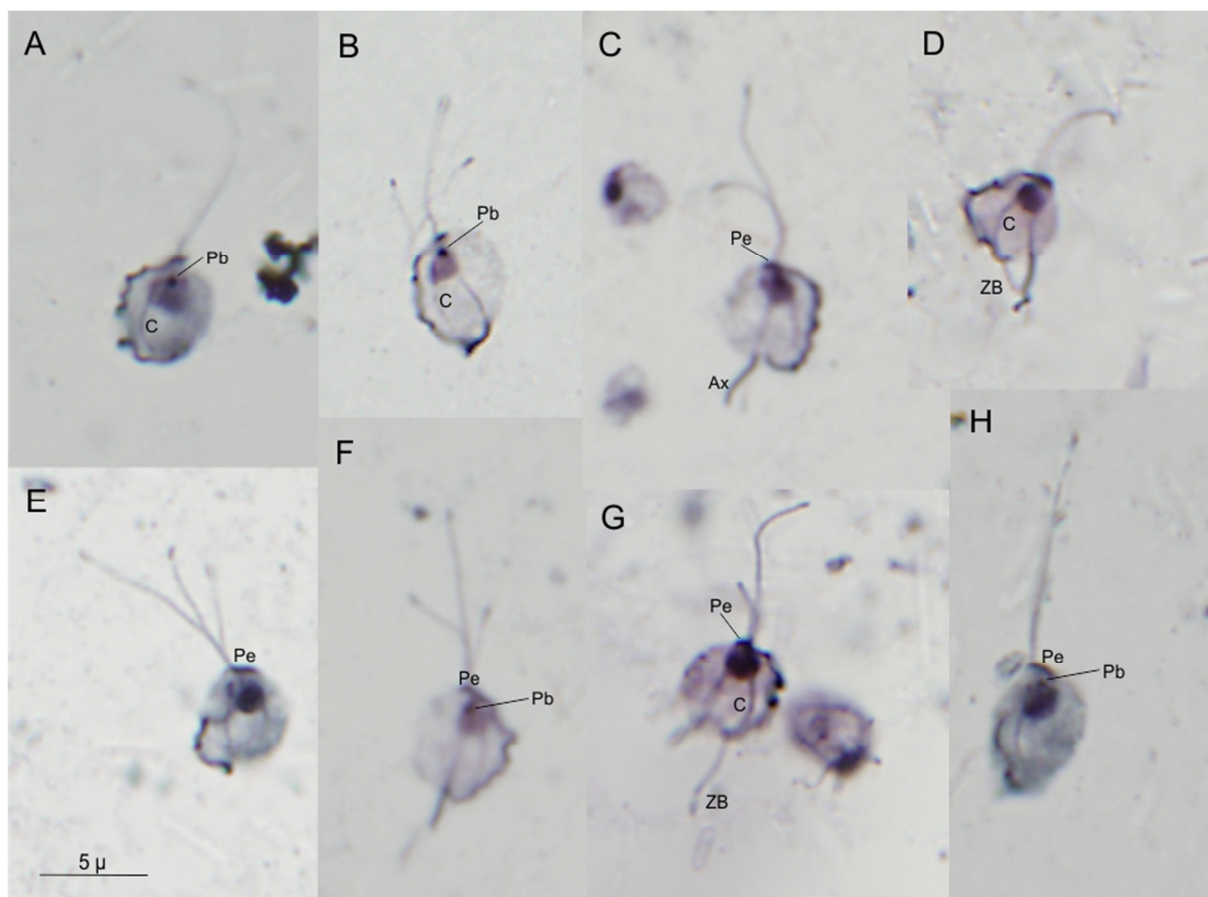


Obr. 16: Fotografie izolátů linie 10. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.10. Morfologie ovčí linie

Délka těla buněk z nově objevené „ovčí“ linie (obr. 17) odpovídala zhruba buňkách z linie 10, nicméně tvar byl více kulatější. Počet předních bičíků byl s malými výjimkami tři. Parabasální aparát nebyl příliš veliký, spíše střední (vzhledem k velikosti buněk). Pelta byla nepřiliš

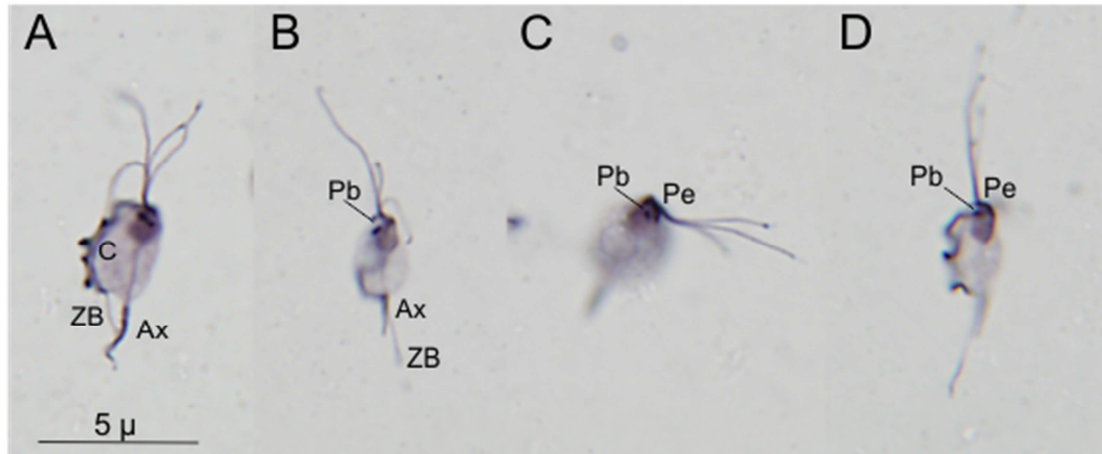
nápadná, celkem nízká. Kosta byla pozorovatelná, nicméně nebyla až tak výrazná jako např. u linie 10. Volný konec zpětného bičíku dosahoval zhruba délky těla buňky. Undulující membrána byla poměrně vysoká spíše s menšími vlnami.



Obr. 17: Fotografie izolátů linie ovce. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zpětný bičík.

4.4.11. Morfologie izolátu KOZA2

Tyto fotografie jsou pořízeny pro účely srovnání morfologie skupiny A a B (obr. 18)



Obr. 18: Fotografie izolátů KOZA2. Barveno protargolem. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabasální aparát, Pe – pelta, ZB – zvětšený bičík.

5. Diskuze

5.1. Fylogenetická analýza

5.1.2. sekvence SSU rDNA

Jedním z cílů této diplomové práce bylo odhalit vztahy v rámci rodu *Tetratrichomonas* (především skupiny A) a tyto vztahy následně porovnat s dosud publikovanými výzkumy. Z výsledků našich fylogenetických analýz je jasné patrné, že jsou v souladu s již dříve publikovanými analýzami (Cepicka et al., 2006; Dufernez et al., 2007; Mantini et al., 2009; Smejkalová et al., 2012). V obou variantách fylogenetického stromu sestaveném ze sekvencí SSU rDNA (s ponechanými i bez ponechaných inzercí) byla skupina A rodu *Tetratrichomonas* zobrazena jako monofyletická. Bohužel ani u jedné z variant však monofylie nebyla dostatečně podpořena.

Pokud jde o postavení jednotlivých linií uvnitř skupiny A, obě varianty fylogenetického stromu se lišily především postavením nové „linie ovčí“ a linie LP. Linie LP je reprezentována jediným zástupcem LP, který byl izolován z člověka trpícího pleurálním empyémem (nahromadění hnisu v pleurální dutině) (Mantini et al., 2009). V prvním fylogenetickém stromě (bez inzercí) tato linie tvořila bazální linii celé skupiny A. Ve druhé variantě stromu s ponechanými inzercemi se její pozice od báze skupiny přesunula hlouběji a linie LP tvořila sesterskou linii k linii 10 a tzv. novel lineage 2 (Smejkalová et al., 2012). Bohužel z těchto výsledků prozatím nelze zjistit, která ze dvou pozic je blíže realitě, protože ani v jedné variantě fylogenetických stromů sestavených ze sekvencí SSU rDNA nebyla daná pozice dobře statisticky podpořena. V analýze publikované v roce 2012 (Smejkalová et al., 2012) však pozice linie LP na bázi skupiny A byla velmi dobře statisticky podpořena. Tuto pozici, avšak již bez výraznější statistické podpory, zaujímala i v článku, ve kterém byla linie LP poprvé publikována (Mantini et al., 2009).

Všechny nově osekvenované izoláty z ovce (OVCE4, OVCE5, OVCE6) tvořily v obou variantách fylogenetického stromu samostatnou skupinu. Pozice této ovčí linie byla rovněž nejednoznačná v závislosti na předchozím sestřihu sekvencí. Na obr. 6 se celá skupina poměrně brzy oddělila od zbývajících linií skupiny A a zaujala pozici blízkou liniím 10 a novel lineage 2. Na obr. 7 se pozice ovčí linie opět posunula dále od báze a zaujala sesterskou

pozici k liniím 4 a 5. Vyjasnění či upřesnění problematiky pozice této nově objevené linie nepřinesla ani analýza sekvencí ITS regionu a bude tedy nejspíš otázkou dalších studií.

Pokud srovnáme pozice zbývajících linií, jsou více či méně potvrzeny předchozí studie (Cepicka et al., 2006; Smejkalová et al., 2012). Tyto dvě analýzy byly vybrány jako referenční z toho důvodu, že další dvě ze zmíněných publikací (Dufernez et al., 2007; Mantini et al., 2009) se vztahům uvnitř linie A nevěnovaly tak detailně, jak by bylo pro tuto práci potřeba. Články zmíněné v úvodu (Dimasuay and Rivera, 2013 a Ibañez-Escribano et al., 2013) byly publikovány v době, kdy už byla finalizována naše fylogenetická analýza, nové izoláty v ní tudíž nejsou zastoupeny. Fylogenetický strom na obr. 6 spíše odpovídá analýzám autorů Smejkalová et al., 2012, strom na obr. 7 pak spíše práci Cepicka et al., 2006. Nicméně stromy z obou analýz se velmi podobají jak sobě navzájem, tak i stromům z našeho výzkumu. V obou variantách námi vytvořeného fylogenetického stromu je jasně patrná příbuznost linií 1, 2 a 9, ke kterým je pak vždy sesterská linie 3. Ačkoliv toto uskupení čtyř linií je silně podpořeno jen v jedné z variant stromu (obr. 7), skutečnost, že tyto linie jsou si velmi blízké ve všech publikovaných analýzách, bude nejspíš toto tvrzení podporovat.

V obou variantách stromu byla naopak dobře potvrzena velmi blízká příbuznost linií 4 a 5, což je opět v souladu s předchozími studiemi. Příbuznost linií 6 a 7 nebyla dostatečně podpořena ani v jedné variantě našeho stromu, nicméně stejně jako v případě linií 1, 2, 3 a 9, je příbuznost předpokládána již z předchozích publikovaných analýz. Pozice linie 8 je v obou variantách našeho stromu vždy poblíž linií 4, 5 a linií 6, 7. Zbývající linie 10 a novel lineage 2 jsou v obou variantách stromu blízce příbuzné. Pro tuto příbuznost opět nemáme dostatečnou podporu, nicméně v článku Smejkalová et al., 2012, je toto tvrzení velmi dobře podpořeno.

5.1.3. Sekvence ITS regionu

ITS region byl pro fylogenetickou analýzu využit, aby lépe odkryl vztahy uvnitř skupiny A rodu *Tetratrichomonas* (sekvence SSU rDNA jsou využívány pro rozlišení diverzity eukaryotických linií obecně). Ve stromě sestaveném na základě sekvencí tohoto regionu (obr. 8) byla monofylie skupiny A tentokrát velmi dobře potvrzena. Opět se v tomto stromě objevila linie LP jako bazální celé skupině A, tentokrát s velmi dobrou statistickou podporou. To je však v rozporu s analýzou v publikaci Smejkalová et al., 2012, ve které se objevuje poměrně

hluboko a sesterská k linii 4, nicméně statistická podpora v této práci není až tak silná. V analýzách z roku 2006 (Cepicka et al., 2006) tato linie není zařazena, neboť byla objevena až o tři roky později. V publikaci Mantini et al., 2009 byla provedena pouze analýza SSU rDNA sekvencí. Nelze tedy spolehlivě určit přesnou pozici dané linie a k odhalení správného umístění této linie bude nejspíš potřeba dalších výzkumů.

Ačkoliv byla linie ovcí v předcházejících analýzách vždy poměrně blízká linii LP, nyní byla její fylogenetická pozice poměrně odlehlá. S poměrně dobrou podporou se větvila jako sesterská linii 6. Vzhledem k tomu, že ve všech variantách stromu (SSU rDNA i regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2) zaujímala odlišnou pozici, bude nutný další výzkum.

Linie 6 potvrdila své postavení z předchozích analýz a opět byla s poměrně dobrou statistickou podporou umístěna jako sesterská k linii 7. Ke všem třem zmíněným liniím (ovčí, linie 6 a 7) zaujala sesterskou pozici linie 8, což je v souladu s již publikovanými výsledky zmíněných autorů. Podpora je však v našich analýzách velmi nízká. Ačkoliv analýza ITS regionu měla pomoci odkrýt vztahy uvnitř skupiny A, prakticky žádné vztahy nebyly dostatečně podpořeny (kromě větvení nové linie ovcí, linie 6, 7 a bazální linie LP).

Nově osekvenovaný izolát HER5 byl zařazen do linie 2, která opět potvrdila své postavení jako sesterské k linii 1. Poblíž této dvojice linií se opět objevila i linie 3. Příbuznost těchto tří linií se projevila napříč všemi analýzami. V předchozích analýzách založených na sekvencích SSU rDNA se však mezi těmito třemi liniemi ještě objevovala linie 9 jako velmi blízké příbuzná liniím 1 a 2. Podobný stav se objevil i v analýzách z roku 2006, 2007, 2009 i 2012 (Cepicka et al., 2006; Dufernez et al., 2007; Mantini et al., 2009; Smejkalová et al., 2012), a byl zde vysvětlen jako artefakt způsobený dlouhou větví linie 9.

Stejně tak byly potvrzeny blízké vztahy linií 10 a novel lineage 2 a samozřejmě i linií 4 a 5. Zajímavé je, že linie 1, 2 a linie 4, 5, jejichž postavení bylo napříč analýzami prakticky neměnné, potvrdily svou podobnost i morfologicky (viz dále). U linií 6 a 7, jejichž blízké pozice byly taktéž potvrzeny ve všech provedených analýzách, však nelze toto tvrzení doložit, neboť zástupce linie 6 se dosud nepodařilo kultivovat v té míře, aby mohly být vytvořeny preparáty pro morfologickou analýzu, popř. jejich kultury ve sbírkách PŘF UK již chybí. Morfologická analýza taktéž nebyla ze stejného důvodu provedena u zástupců linie 9.

5.2. Morfologická analýza

Na základě fylogenetických analýz bylo zjištěno, že rod *Tetratrichomonas* se rozpadá na dvě velké skupiny A a B, a v rámci každé skupiny na několik linií. Cílem této práce bylo zjistit, zda se pro tyto vztahy a vztahy uvnitř skupiny A dají vysledovat i morfologické znaky, které by výsledky této fylogenetické analýzy podpořily.

5.2.1. Liší se morfologicky skupiny A a B ?

Tato práce se orientovala především na skupinu A, nicméně jako referenční zástupce pro potvrzení či vyvrácení této teorie byl vybrán izolát KOZA2, který byl při vzniku této práce nově izolován. Jeho pozice ve fylogenetickém stromě (ať už SSU rDNA či ITS regionu), byla vždy někde uvnitř linie 15, tzn., jednalo se pravděpodobně o druh *Tetratrichomonas gallinarum*. Tento druh byl původně považován za striktního střevního parazita ptáků, nicméně v roce 2005 byl popsán i z dutiny ústní, průdušek a výměšku dýchacích cest (tzv. sputum) člověka (Kutišová et al., 2005). V roce 2012 byla přítomnost tohoto druhu zaznamenána i u primátů, konkrétně *Lemur catta* (Smejkalová et al., 2012). V případě druhu *Tetratrichomonas gallinarum* tedy nejspíš půjde o složitý komplex několika druhů, z nichž některé vykazují vysokou hostitelskou specifitu (Cepicka et al., 2005). V našem případě byl tedy další zástupce druhu *T. gallinarum* izolován z kozy domácí (*Capra aegagrus hircus*), nicméně nelze přesně určit, zda jde o samostatnou linii v rámci komplexu *T. gallinarum* (pravděpodobně shodnou s izolátem z lemura) reprezentující samostatný druh z celého předpokládaného komplexu či nikoliv.

Ze získaných nabarvených preparátů KOZA2 se zdá, že zástupci skupiny B mají výrazně silnější axostyl v poměru k velikosti těla než ostatní zástupci skupiny A. Žádné přesnější měření však neproběhlo, toto tvrzení je tedy zatím podloženo jen přiloženými fotografiemi. Z popisu *T. limacis* (Kozloff, 1945) a *T. prowazeki* (Honigberg, 1951) se také zdá, že axostyl je silnější než u skupiny A. Zástupci skupiny A mají také častěji čtyři přední bičíky.

5.2.2. Liší se jednotlivé linie v rámci skupiny A ?

Dalším z cílů této práce bylo také vyřešit otázku, zda se jednotlivé linie skupiny A, které byly prokázány fylogenetickou analýzou, odlišují i morfologicky a zda je možné tyto morfologické

znaky určitým způsobem generalizovat. Pro zodpovězení této otázky bylo využito jak porovnávání jednotlivých znaků na těle buňky (především velikost parabasálního aparátu, výška a mohutnost pely, síla kosty, počet předních bičíků), tak metrické vlastnosti příslušných buněk. Pro porovnání jednotlivých znaků se nám jevilo jako nejlepší barvení kultur pomocí protargolu. Tímto způsobem barvení jsou dobře viditelné všechny struktury, které nás pro tento výzkum zajímaly (jádro, cytoplasma, bičíky a všechny mikrotubulární struktury). Nicméně jde o poměrně náročnou (především časově) metodu a bohužel ne vždy jsou zaručeny spolehlivé výsledky.

Z důvodu nutnosti prozkoumání poměrně velkého množství preparátů bylo pro potřeby měření stanoveno, že tyto údaje budou odečteny u 30 buněk z každého vzorku. Situaci značně ztěžovalo to, že ne všechny buňky bylo možné ihned změřit (daná buňka musela být ve vhodné poloze pro měření). Komplikací se v tomto směru také ukázalo, že ne všechny obarvené kultury byly kvantitativně dostačující počtem buněk zkoumaného organismu.

Přes všechny zmíněné problémy nakonec vznikla tabulka s příslušnými rozměry jednotlivých linií. Z té jsou patrné určité rozdíly ve velikosti buněk jednotlivých linií, nicméně otázkou zůstává, do jaké míry jde o spolehlivý znak. Z praxe je známo, že buňky při fixaci značně mění svou velikost a tvar. Nicméně budeme-li předpokládat, že všechny buňky reagovaly na fázi fixace přibližně stejně (protože jde o jeden rod), poměry zjišťovaných velikostí by měly být zachovány přibližně stejné jako u živých buněk. Další otázkou je také reakce buněk na uměle vytvořené prostředí v kultivačním médiu. Některé dělící se buňky mohou mít menší počet bičíků, proto když se populace ve velké míře dělí, převažují v ní buňky s méně bičíky (např. Honigberg, 1963).

Z příslušné tabulky lze tedy vyčíst, že linie 1, 2 a 8 se svou velikostí řadí mezi nejmenší. Přibereme-li k této skutečnosti další zjišťovanou vlastnost, a to počet předních bičíků, je jasné, že podobné jsou si jen linie 1 a 2, které měly u velké většiny pozorovaných buněk pouze dva přední bičíky. Určitou výjimku lze pozorovat u izolátu IVB5 z linie 2, u kterého také převažovaly dva přední bičíky, nicméně počet jedinců s třemi předními bičíky byl velmi vysoký a výrazně se blížil počtu buněk se dvěma předními bičíky. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že izolát IVB5 byl směsí více linií a linie 2 tvořila v této směsi jen nepatrně větší část než všechny ostatní. To, že se v případě tohoto izolátu jednalo o směs více linií, máme potvrzeno i sekvencemi. Jediným opravdovým vzorkem z linie 2 tak byl prakticky pouze vzorek HER5, u kterého se počet předních bičíků shodoval s počty u vzorků z linie 1. Tyto dvě linie se

shodovaly i v dalších morfologických znacích. Výrazným znakem obou linií byla spirálně stočená undulující membrána. Toto spirální vinutí nebylo nalezeno u žádné ze zbývajících linií. Dalšími shodnými znaky obou linií byla velmi slabá, až téměř nepozorovatelná kosta, malý parabasální aparát a velmi nízká pelta. Pozorování pelty zároveň ztěžovala zmíněná spirální undulující membrána spolu s velmi malou výškou pelty, proto i na pořízených fotografiích není pelta dobře viditelná. Všechny tyto morfologické znaky pozorované u obou linií jen podporují fylogenetickou analýzu, která ve všech případech prokázala jejich značnou příbuznost.

Výrazně větší než zástupci všech ostatních linií skupiny A byli zástupci linie 4 a 5, jejichž buňky naopak patřili mezi ty největší. Zohlednění počtu předních bičíků v tomto případě není tak jednoznačné jako u předcházejících linií. U linie 4 se u dvou vzorků ze tří zkoumaných objevila převaha buněk se čtyřmi předními bičíky. U třetího vzorku (GERA3) byla naopak jasná převaha tří předních bičíků. Určitým vysvětlením by mohla být skutečnost, že v kultuře mohlo dojít k rychlému namnožení buněk a tudíž k nedostatečnému vyvinutí všech předních bičíků. Nicméně zmíněný izolát GERA3 nebyl pro účely této práce resekvenován (tudíž ani kultivován), takže nelze s určitostí říci, zda a případně z jakého důvodu k tomuto jevu došlo. U linie 5 byla naopak zjištěna převaha tří předních bičíků, nicméně tento počet nelze zcela potvrdit, neboť u druhého vzorku z příslušné linie nebylo z důvodu velmi špatného nabarvení možné přesný počet bičíků odečíst. Zda je tedy počet předních bičíků u obou linií odlišný nelze s ohledem na příslušné komplikace jednoznačně potvrdit. Pokud srovnáme další morfologické znaky obou linií, prakticky se shodují. Charakteristický je pro obě linie oválný tvar těla, dobře patrná je silnější kosta. Parabasální aparát patřil mezi největší ze všech zkoumaných linií. Nápadná byla i poměrně vyšší pelta. Volná část zpětného bičíku byla přibližně stejně dlouhá jako tělo buňky. Undulující membrána byla ve všech případech velmi dobře vyvinutá, značně vysoká a s velkými vlnami. Stejně jako v případě linií 1 a 2 tedy morfologické znaky (až na počty předních bičíků) dobře podporují předešlou fylogenetickou analýzu, ve které si byly linie 4 a 5 vždy velmi blízce příbuzné.

U linie 3 byla naměřená velikost o něco větší než u linií 1, 2 a 8, které patřily mezi nejmenší. Převažovaly formy se třemi předními bičíky. Tvar těla byl oválný, pelta byla dobře patrná, spíše vyšší. Parabasální aparát byl větší. Jediným výrazným znakem byl velmi dlouhý volný konec zpětného bičíku, který v některých případech přesahoval i dvojnásobek délky těla buňky.

Buňky linie 7 patřily svou délkou mezi ty větší. U dvou ze tří vzorků panovala jasná převaha forem se třemi předními bičíky, u izolátu PD22D však došlo k výjimce a naprostá většina buněk tohoto izolátu měla pouze dva přední bičíky. Zároveň měl tento vzorek i nejmenší velikost (byl téměř o 1 μm menší) ze všech ostatních vzorků patřících do této linie, což by mohlo nahrávat verzi s rychlým nárůstem počtu buněk při kultivaci v médium a tudíž nedokonalému vyvinutí všech předních bičíků. Kosta byla slabší, pelta nepříliš vysoká a parabasální aparát poměrně veliký. Undulující membrána byla spíše nižší s větším počtem menších vln. Volný konec zpětného bičíku byl dlouhý zhruba jako celá délka těla buňky.

Linie 8 byla zastoupena dvěma izoláty. Průměrná délka buněk u obou vzorků byla téměř shodná s buňkami linií 1 a 2. Nicméně tvarem těla linií 1 a 2 již neodpovídaly. Tvar těla buněk byl mnohem méně kulatý než u zmiňovaných dvou linií. Je tedy pravděpodobné, že buňky linie 8 jsou více laterálně zploštělé, což by potvrzovalo pozorování autorů Cepicka et al., 2006. Bohužel šlo opět o velmi špatně obarvené preparáty, což značně komplikovalo jak samotné pozorování, tak především následné focení. Nejlépe lze tak toto laterální zploštění pozorovat na obr. 15 C. Počet předních bičíků u této linie bude pravděpodobně tři. U izolátu JUDITA byl tento počet s velkou převahou potvrzen, u vzorku BOSSO nebylo z důvodu špatného nabarvení buněk možné počty odečíst u všech 50 buněk, nicméně poměr pozorovaných bičíků u tohoto izolátu odpovídá počtu odečtenému u izolátu JUDITA. Srovnáme-li velikost parabasálního aparátu s jeho velikostí u linií 1 a 2 (protože jde rozměrově o podobné organismy), u linie 8 je podstatně větší. Výraznější je i pelta. Kosta je také slabá, nicméně výraznější než u linií 1 a 2. Volný distální konec zpětného bičíku je nápadně dlouhý podobně jako u linie 3.

Zástupce linie 10 lze zařadit díky své velikosti těla mezi ty větší. Tvar těla buňky byl oválný. Počet předních bičíků nebyl zcela jednoznačný. U izolátu CHERS3 byl počet tří předních bičíků ku čtyřem poměrně jednoznačně prokazatelný (56:4), u dalších dvou zástupců to již tak jednoznačné nebylo. Izolát 34-1 měl poměr tří předních bičíků ku čtyřem 37:13, izolát GEPA2, ačkoliv se nedaly z důvodu špatného nabarvení odečíst bičíky u všech 50 buněk, měl poměr těchto bičíků obdobný (7:4). Zcela opačně tomu bylo u posledního ze čtyř izolátů této skupiny, GSIA1, jehož poměr buněk se třemi bičíky ku čtyřem předním bičíkům byl 14:34. Je možné, že se zástupci této linie mohou s podobnou pravděpodobností objevovat jak se třemi, tak se čtyřmi předními bičíky. Dalším vysvětlením by mohla být chyba v určování. Právě u izolátu GSIA1 bylo nápadné, že čtvrtý bičík je velmi krátký, tudíž při horším nabarvení

preparátů by byl prakticky nepozorovatelný. Parabasální aparát byl větší, oválný. Pelta byla velmi dobře viditelná a velmi vysoká. Kosta byla velmi výrazná a prakticky nejsilnější z dosud sledovaných.

Poslední z linií, nově objevená linie ovcí, svou délkou těla odpovídala linii 10. Na pohled však byl jejich tvar těla více kulatý, což mohlo být způsobeno tím, že jejich undulující membrána byla vyšší než u linie 10. Převažující počet předních bičíků byl u obou ze zkoumaných izolátů shodný, takže lze s celkem velkou pravděpodobností říct, že zástupci této linie mají tři přední bičíky. V tabulce měření izolátů je uvedeno měření pro izolát OVCE4,5. Šlo sice o dvě nově izolované kultury (OVCE4, OVCE5), nicméně později se zjistilo, že tyto kultury jsou shodné, proto bylo měření obou kultur spojeno do jednoho měření. Parabasální aparát této linie je poměrně malý. Nízká a poměrně hodně nevýrazná vzhledem k velikosti těla je i pelta. Kosta byla dobře pozorovatelná, ale nedosahovala takové síly, jako tomu bylo u linie 10 (porovnávalo se vzhledem k síle předních bičíků). Volný distální konec zpětného bičíků nebyl výrazně dlouhý, dosahoval zhruba délky těla buňky. Undulující membrána byla vyšší s malými vlnami, což bylo odlišné od undulující membrány u linie 10, která nebyla tak vysoká a vlny byly znatelně větší a v menším počtu.

Příslušné linie skupiny A se tedy morfologicky liší. Lze říci, že určité linie (či skupiny linií) tvoří jednotlivé druhy ve smyslu morfospecies.

Charakteristické znaky pro linii 1 a 2, které tvoří jeden druh ve smyslu morfospecies jsou: kulatý tvar těla, dva přední bičíky, spirální undulující membrána, velmi slabá kosta, nízká pelta. Dalším jednoznačně odlišitelným druhem je linie 4 a 5. Pro obě linie jsou charakteristické tyto znaky: značná velikost těla buněk, oválný tvar těla, obrovský parabasální aparát, vyšší pelta, silnější kosta, 3 – 4 přední bičíky, velmi dobře vyvinutá vysoká undulující membrána s velkými vlnami. Samostatným druhem je linie 7, jejíž charakteristické znaky jsou: oválný tvar těla, 3 – 4 přední bičíky, poměrně velký parabasální aparát, slabší kosta, nižší pelta. Linie 10 tvoří také samostatnou, morfologicky specifickou linii. Znaky této linie: velmi silná kosta, vysoká pelta, 3 - 4 přední bičíky, undulující membrána s poměrně velkými vlnami. Nová linie ovcí byla velmi podobná linii 10 avšak s určitými rozdíly: kulatější tvar těla, nižší pelta, slabší kosta, undulující membrána s menšími vlnami.

U zbývajících linií nejsou jejich znaky pro to, aby se dalo považovat je za druhy ve smyslu morfospecies, až tak výrazné, nicméně mezi všemi liniemi jsou patrné jisté odlišnosti.

Vezmeme-li v úvahu i fylogenetickou analýzu, ve které tyto dvě linie vyšly jako odlišné, nejspíš se také bude jednat o samostatné druhy.

5.2.3. Odpovídají jednotlivé linie skupiny A některým z již popsaných druhů?

Některé z příslušných linií skupiny A byly již popsány jako již dříve známé druhy. Jako *Tetratrichomonas brumpti* (Honigberg, 1951) byly v publikaci Cepicka et al., 2006 určeny linie 4 a 5. Dle měření z tohoto článku (Honigberg, 1951) byla průměrná délka těla jednotlivých buněk 9 μm (5,5 – 13) a šířka buněk 7,25 μm (4,5 – 11). U našeho měření šlo o největší buňky ze všech ostatních linií skupiny A, nicméně takovýchto rozměrů nedosahovaly. Je však potřeba zmínit, že rozměry buněk tohoto druhu se velmi lišily i v případě měření v článku Honigberg, 1951. Zmíněné průměrné hodnoty délky a šířky těla buněk byly naměřeny u izolátu z hostitele *Testudo* sp., nicméně měření se ještě prováděla pro buňky izolované z druhu *Testudo hoodensis* a z druhu *Gopherus agassizii*. Nejen, že se objevily značné rozdíly u průměrných hodnot měření mezi těmito dvěma druhy, ale obrovské rozdíly se našly i ve velikostech buněk z těchto dvou dílčích měření a z měření prvního. Sám autor to vysvětluje tím, že u mnoha polymastigotních druhů jsou celkem běžné i větší rozdíly v měření buněk ze dvou populací morfologicky shodného druhu izolovaného ze dvou jedinců stejného hostitele. Kultivované formy mají také častěji tendenci dosahovat větších rozměrů než jedinci izolovaní přímo ze střevního materiálu. Je tedy zjevné, že změnou podmínek prostředí (změna množství potravy či změna frekvence přenosu) lze výrazně ovlivnit velikost kultivovaného organismu.

Počet předních bičíků tohoto druhu je dle popisu publikovaném v roce 1951 čtyři (Honigberg, 1951). Objevily se však i buňky se třemi předními bičíky a to v celkem nezanedbatelném počtu. Dle pozorování buněčného cyklu jsou tyto tříbičíkatí jedinci ne zcela vyvinuté formy. Toto tvrzení je podpořeno pozorováním, ve kterém formy se třemi předními bičíky nedosahovaly rozměrů buněk se čtyřmi předními bičíky. Toto pozorování plně koresponduje s našimi výsledky. Dalšími znaky, ve kterých se naši zástupci linií 4 a 5 shodují s druhem *Tetratrichomonas brumpti* je kosta, undulující membrána, parabasální aparát, pelta a axostyl. Kosta by dle popisu měla být zhruba stejně silná jako přední bičíky. Undulující membrána je charakteristická několika výraznými vlnami, volný konec zpětného bičíku, který tvoří undulující membránu, je dle publikovaných výsledků zhruba stejně dlouhý jako tělo

buňky. I v tomto znaku se publikovaný druh *T. brumpti* shoduje s našimi izoláty. Parabasální aparát byl velký, diskovitý. Pelta by měla mít srpkovitý tvar a měla by být velmi výrazná. Axostyl je dle publikace štíhlá hyalinní a rovná struktura, probíhající středem těla buňky. Část axostylu vybíhající z těla buňky je dlouhá průměrně 3,75 μm , což s ohledem na publikované rozměry buněk činí necelou polovinu těla. I v našem pozorování byla část axostylu vyčnívající z těla buňky poměrně dlouhá, poměrově prakticky srovnatelná s tímto publikovaným rozměrem. Jádru by mělo mít vejčitý či elipsoidní tvar. Tento tvar jádra byl pozorován i u našich izolátů.

Z tohoto srovnání je poměrně jasně patrné, že linie 4 a 5 jsou opravdu nejspíš druhem *Tetratrichomonas brumpti* (Honigberg, 1951), jak bylo uvedeno v článku Cepicka et al., 2006. Další z předpokládaných linií, která by mohla představovat již popsany druh, je linie 7. Tato linie by dle předpokladu publikovaném v článku Cepicka et al., měla reprezentovat druh *Tetratrichomonas buttreyi*, který byl izolován z prasat (Hibler et al., 1960). Dle měření z příslušné publikace (Hibler et al., 1960) byla průměrná délka těla buněk 5,92 μm ($\pm 0,79$) a průměrná šířka těla 3,44 μm ($\pm 0,82$). Srovnáme-li tyto výsledky s naším měřením, průměrná délka těla zhruba odpovídá (s malými rozdíly). Určitý rozdíl mezi našimi a publikovanými výsledky může být dán tím, že v našem případě probíhalo měření u 30 buněk z každého izolátu, v případě měření v článku Hibler et al., 1960 toto měření probíhalo u 300 jedinců. Tvar těla byl elipsoidní, někdy však i značně protáhlý. Tento tvar těla měly buňky i v našem pozorování.

Počet předních bičíků bohužel nebyl zaznamenán v žádné statistice, bylo jen zmíněno, že se objevovaly buňky se třemi i čtyřmi předními bičíky různých délek. Občas byla objevena i buňka se dvěma předními bičíky, nicméně to autor vysvětlovat pravděpodobnou ztrátou jednoho či více bičíků během fixace či špatným pozorováním bičíků u živých buněk. V našem případě byly u buněk linie 7 nalezeny tři přední bičíky. Pouze u jednoho z izolátů (PD22D) bylo nalezeno velké množství forem se dvěma předními bičíky. Jelikož v publikaci chybí přesnější údaje o poměrech nalezených forem se třemi či čtyřmi předními bičíky, nelze jednoznačně určit, zda se naše pozorování s pozorováním publikovaném v článku Hibler et al., 1960 shoduje či nikoliv. Nicméně lze říci, že tak jako v případě Hibler et al., 1960, byly nalezeny formy se čtyřmi, třemi i se dvěma předními bičíky.

Síla kosty by se měla přibližně shodovat se silou předních bičíků a volného distálního konce zpětného bičíku. V našem případě je kosta jen o něco málo slabší než přední bičíky a

volný konec zpětného bičíku, tudíž lze předpokládat, že to lze považovat za odpovídající pozorování v článku Hibler et al., 1960. Později však také dodává, že kosta je poměrně jemná.

Undulující membrána by měla být poměrně vysoká. Nebylo pozorováno žádné charakteristické vlnění, nicméně u několika fixovaných a u všech živých buněk byly pozorovány tři až čtyři jemné vlny. V našem pozorování byla undulující membrána zhodnocena jako spíše nižší. Poněkud problematické je, že v našem případě nedošlo k žádnému přesnému měření tohoto údaje, proto je posouzení výšky undulující membrány poměrně subjektivní. Vlny u námi hodnocených buněk byly spíše jemnější, menší, což odpovídá tvrzení v článku Hibler et al., 1960. Volná část zpětného bičíku byla zhruba stejně dlouhá jako celé tělo buňky, což se shodovalo i s našimi výsledky.

Axostyl by měl být poměrně úzký a u fixovaných preparátů zakřivený, ohnutý či nějakým způsobem zkroucený. U našich preparátů bylo také pozorováno určité zakřivení, nicméně nebylo nijak výrazné. Srovnáme-li to s perokresbami tohoto druhu ve zmiňovaném článku, lze míru zakresleného zahnutí považovat za obdobnou té, jaká byla nalezena u našich zástupců. Délka vyčnívající části axostylu by měla dosahovat 2/3 délky těla, nicméně sám autor dodává, že se objevovaly značné individuální odchylky. Nejde tedy nejspíš o příliš dobrý určující znak. I v našem pozorování se objevovali jedinci s délkou vyčnívající části axostylu blížící se dvěma třetinám délky těla, nicméně i v našem případě jsme tento znak shledali jako nepříliš průkazný.

Jádro buňky by mělo být oválné, byla však sledována vysoká míra proměnlivosti tvaru. Naši pozorovaní zástupci měli tvar jádra vždy více či méně oválný. Dorzolaterálně od jádra se nacházel parabasální aparát, jehož diskovitý tvar se shodoval s tvarem popsáním ve zmíněném článku (Hibler et al., 1960).

V článku bohužel nebyla popsána struktura pely, nelze ji tedy srovnat s peltou u námi sledovaných jedinců. Jelikož však nebyla popsána, lze předpokládat, že nebyla příliš výrazná, což by se mohlo teoreticky shodovat s naším popisem, ve kterém ji shledáváme jako nízkou.

Na základě tohoto srovnání lze potvrdit, že znaky se jen s malými odlišnostmi a výjimkami shodují se znaky druhu *T. buttreyi*, který byl izolován z prasat (Hibler et al., 1960). Lze tedy potvrdit, že linie 7 by měla s největší pravděpodobností představovat druh *Tetratrichomonas buttreyi*.

Dle publikace Cepicka et al., 2006 reprezentanti linie 10 morfologicky připomínají druh *Tetratrichomonas buttreyi*, který byl izolován z dobytka (Jensen and Hammond, 1964). Jako *T. buttreyi* byla již popsána linie 7, nicméně v případě této linie šlo o *T. buttreyi* izolovanou z prasat (Hibler et al., 1960). Ačkoliv autoři Jensen and Hammond, 1964 popsali druh izolovaný z dobytka jako shodný s izolátem z prasat, Cepicka et al., 2006 uvedli, že na základě porovnání barvených preparátů, které obdrželi z Kuby, se druh izolovaný z dobytka neshoduje s původní *T. buttreyi* z prasat (Hibler et al., 1960). Ani naše linie 10 se morfologicky neshoduje s linií 7, je tedy jasné, že v případě *T. buttreyi* z dobytka (Jensen and Hammond, 1964) půjde o zcela jiný druh.

Dle našich předpokladů by se mohlo jednat o druh „*Tetratrichomonas ovis*“ (Andersen et al., 1962). Tento druh byl primárně izolován ze střeva ovcí pod jménem *Ditrichomonas ovis* (Robertson, 1932), nicméně později se zjistilo, že jde o dva různé organismy (viz dále) a tudíž nejde o „pravou“ *Tetratrichomonas ovis*. Průměrná délka těla buňky „*T. ovis*“ je 7,1 μm ($\pm 0,8$), šířka těla buňky 6,2 μm ($\pm 0,8$). Tvar těla živých buněk je pyriformní, barvené buňky jsou však více kulaté. Naše buňky z linie 10 nedosahují délky těla 7 μm , délkou však patří mezi větší z buněk. Průměrná délka těla přesahuje 6 μm a vzhledem k již zmíněnému problému velikosti buněk v závislosti na míře živin a změně frekvence přenosu při kultivaci organismů (Honigberg, 1951) lze usoudit, že jsou si naše hodnoty s hodnotami měření pro „*T. ovis*“ prakticky podobné.

Přední bičíky by měly být čtyři, všechny nestejně délky, autor však zmiňuje, že čtvrtý bičík je u barvených preparátů často špatně viditelný a dobře pozorovatelný je jen u pomalu se pohybujících živých buněk. Živé buňky v našem případě nebyly pozorovány. Počet předních bičíků byl většinou tři, nicméně poměrně často byly nalézány i buňky se čtyřmi předními bičíky. V případě izolátu GSIA1 dokonce buňky se čtyřmi předními bičíky v celé kultuře převažovaly. V případě, že přijmeme myšlenku, že šlo skutečně o špatné určení počtu předních bičíků, což nelze vyloučit vzhledem k poměrně velkému počtu buněk se čtyřmi předními bičíky, dostaneme se i v tomto bodě ke shodě s druhem „*T. ovis*“.

Axostyl druhu „*T. ovis*“ je hyalinní a úzký, ke konci se postupně zužuje. Průměrná délka vyčnívající části axostylu z těla buňky je 5 μm . I v našem případě byla naměřená délka axostylu poměrně velká, nedosahovala však až takto vysokých hodnot. Autor však i zde dodává, že u živých buněk bylo často možné pozorovat rapidní změny délky axostylu. Velmi nápadná je u „*T. ovis*“ pelta i kosta. Obě struktury byly jedny z nejvýraznějších i v našem

pozorování. Undulující membrána je u tohoto druhu poměrně vysoká se dvěma až třemi velkými vlnami. Obdobná charakteristika undulující membrány se objevila i v našem pozorování. Volný konec zpětného bičíku má průměrnou délku 5 μm , což je v podstatě necelá délka těla buňky. I u našich zástupců linie 10 byl volný konec zpětného bičíku nepříliš dlouhý, zhruba odpovídal délce těla buňky. Parabasální aparát je u „*T. ovis*“ vždy oválný či vejčitý, u většiny jedinců na stejné straně těla jako je undulující membrána. I tyto znaky odpovídají našemu pozorování. Mezi druhem „*T. ovis*“ a naší linií 10 lze vysledovat poměrně významnou shodu u většiny podstatných znaků. Ačkoliv se objevují určité rozdíly (především ve velikosti, počtu předních bičíků či délce vyčnívající části axostylu), lze tyto rozdíly poměrně jednoduše vysvětlit.

V případě linie 10 by se ještě teoreticky mohlo jednat o druh *Trichomonas pavlovi* (Levine, 1961). Tento druh objevili Pavlov a Dimitrov, 1957, kteří ho izolovali ze střev bulharského dobytka. Ve všech znacích se v podstatě shoduje s druhem „*T. ovis*“ (Andersen et al., 1962), nicméně délka těla je poměrně výrazně větší. Délka těla ovšem není až tak rozhodující znak. V popisu *T. pavlovi*, resp. *Trichomonas bovis* (Pavlov and Dimitrov, 1957), jak ho původně autoři pojmenovali, chybí popis pelty, parabasálního aparátu či kosty. Jelikož jde o poměrně významné znaky, nelze určit, zda jsou druhy *T. pavlovi* (Levine, 1961; resp. *T. bovis*, Pavlov and Dimitrov, 1957) a druh „*T. ovis*“ shodné.

Určitou shodu v morfologii bychom našli i u druhu *Tetratrichomonas didelphidis* (Hegner and Ratcliffe, 1927; Andersen and Reilly, 1965). Svými rozměry se více přibližuje linii 10 (rozměry 6,6 μm x 3,9 μm). Všemi důležitými znaky (silná kosta, počet předních bičíků, axostyl) se shoduje s linií 10, popř. druhem „*T. ovis*“. Jediným rozdílem je však výška pelty. Jak u linie 10 tak u „*T. ovis*“ je pelta výrazná struktura. V případě *T. didelphidis* je však pelta nevýrazná a nízká. Dalším rozdílem by mohl být tvar undulující membrány, u *T. didelphidis* má undulující membrána spíše menší vlny, u linie 10 byly vlny větší a bylo jich méně. Právě tyto rozdíly (nízká pelta, undulující membrána s malými vlnami) odlišují linii 10 a nově objevenou linii ovčí. Je tedy možné, že nová linie ovčí by mohla reprezentovat druh *Tetratrichomonas didelphidis* (Hegner and Ratcliffe, 1927; Andersen and Reilly, 1965; Tasca et al., 2001; Tasca and De Carli, 2004, 2007). Ostatní znaky totiž odpovídají znakům popsáným u této nové linie. Rozdílem je však počet předních bičíků. U ovčí linie byl počet předních bičíků poměrně jednoznačně určen jako tři. Zajímaví jsou však hostitelé. V případě *T. didelphidis* je to vačice opossum (*Didelphis marsupialis*), v případě nové linie je to ovce

domácí (*Ovis aries*). Vačice opossum se vyskytuje především v Jižní a Střední Americe, ovce domácí téměř všude. Vačice je však velmi tolerantní k antropogenním úpravám krajiny, může se tudíž vyskytovat i poblíž lidských sídel či pastvin. V roce 2001 byla *T. didelphidis* izolována ještě z dalšího druhu vačice, *Lutreolina crassicaudata* (Tasca et al., 2001; Tasca and De Carli, 2004, 2007). Morfologicky se jednalo o shodné jedince. I tato vačice tlustoocasá (*Lutreolina crassicaudata*) se vyskytuje v Jižní Americe. Morfologicky téměř shodná s *T. didelphidis* se zdála trichomonáda izolovaná klokanů (*Macropus robustus*, *Dendrolagus inustus*), která byla pojmenována *Tetratrichomonas guttula* (Kirby and Honigberg, 1950). Je velmi pravděpodobné, že tyto dva druhy budou shodné a *T. guttula* je tedy synonymum pro *T. didelphidis*.

Linie 1 a 2 jsou morfologicky odlišné od všech zbývajících linií skupiny A. Charakteristická je pro ně velmi malá velikost těla a především poněkud nestandardní počet předních bičíků. Dalším zajímavým znakem, který sdílí tyto dvě linie je spirálně stočená undulující membrána, vinoucí se kolem těla buňky. Právě díky počtu předních bičíků, poměrně malé velikosti a především i díky kulatému tvaru těla usuzujeme, že by tyto dvě linie mohly reprezentovat druh *Ditrichomonas ovis* (Robertson, 1932), nyní *Tetratrichomonas ovis* (ta je však odlišná od „*T. ovis*“ popsané v článku Andersen et al., 1962, vysvětlení viz dále). Průměrná délka těla *T. ovis* (*D. ovis*) byla 4 μm až 7 μm , přičemž autor dodává, že větších rozměrů dosahovaly buňky, které byly těsně před fází dělení. Nejvíce buněk (128 z 363 změřených) se nacházelo v intervalu 5 – 6 μm , o něco méně pak v intervalu 4 – 5 μm . Se šířkou buněk to bylo velmi obdobné, nejvíce buněk se nacházelo v rozpětí 4 – 5 μm , o něco menší počet buněk pak v intervalu 3 – 4 μm . Sledován byl i poměr délky ku šířce. Nejvíce buněk mělo tento poměr rovný či jen o něco málo vyšší než 1. Z toho lze odvodit nejčastější tvar buňky, který byl stejně jako v našem pozorování, výrazně kulatý.

Jádro *T. ovis* (*D. ovis*) je kulaté, velmi často i mírně oválné, což se plně shoduje s našimi izoláty. Zpětný bičík, tvořící undulující membránu, se v případě *T. ovis* (*D. ovis*) velmi často spirálně obtáčí kolem těla až k posteriornímu konci, kde pokračuje již sám a tvoří tak volný konec zpětného bičíku. I zde se naše preparáty shodují, neboť u velkého počtu buněk z linií 1 a 2 byla nalezena výrazně spirálně stočená undulující membrána. Přední bičíky jsou u *T. ovis* (*D. ovis*) dva, nestejně délky. I u našich buněk byl pozorován stejný počet předních bičíků, u některých se taktéž velmi lišily svou délkou. Axostyl *T. ovis* (*D. ovis*) je na začátku zakřivený, poté již pokračuje rovně. V našem případě bylo velmi komplikované pozorovat axostyl uvnitř

těla buňky, na některých fotkách je však patrné určité zakřivení v horní části axostylu. Jelikož však šlo o pozorování u velmi malého množství buněk, nelze s jistotou říct, že tento znak se u našich buněk shoduje s *T. ovis* (*D. ovis*). Následují znaky, které jsou autorem již velmi špatně popsány, a nejsou tak zcela průkazné.

Parabasální aparát byl zmíněn jen jako jakýsi bod nacházející se vedle jádra a předpokládal, že by se mohlo jednat o parabasální aparát tak, jak ho popsal Grassé (1926). Z tohoto popisu nelze zcela usuzovat, zda měl tento bod tvar odpovídající parabasálnímu aparátu u našich buněk. Dalším problémem se ukázala pelta, která tu autorem nebyla zmíněna vůbec. Zmiňuje se však o jakémisi „malém otvoru do cytoplasmy“, který se nachází u místa, odkud vybíhají přední bičíky. Tento „otvor“ byl viditelný u barvených preparátů a dle autora by mohl představovat buněčná ústa. U trichomonád se však žádná buněčná ústa nevyskytují a tudíž lze z pozice tohoto útvaru předpokládat, že by se mohlo jednat o peltu. O dalších detailech tohoto útvaru se však již dále nezmiňuje. Pokud by se jednalo o velmi výrazný útvar, předpokládáme, že by následoval detailnější popis této struktury. Ze zmíněného lze tedy předpokládat, že útvar byl patrný, nicméně nedosahoval výrazné výšky. To by mohlo korespondovat s naším pozorováním, ve kterém byla sice pelta patrná, nicméně výška byla velmi malá a často tak byla pelta překryta vlnící se undulující membránou.

Jednoznačné tvrzení, že v případě linií 1 a 2 jde o druh *Tetratrichomonas ovis* (*D. ovis*), není z důvodu nedostatečného popisu možné. Nicméně lze potvrdit, že obě linie se ve všech znacích, které byly v článku Robertson, 1932 popsány, prakticky shodují. Žádná podobná tetratrichomonáda nebyla do této doby zatím nalezena, srovnání s jinými popsány druhy tedy není v tuto chvíli možné.

Výrazná spirální membrána byla zachycena ještě u druhu *Tetratrichomonas microti* (Wenrich and Saxe, 1950), v tomto případě měly však sledované buňky čtyři přední bičíky a výraznou kostu, což je v rozporu s naším pozorováním.

V případě linií 3 a 8 pravděpodobně prozatím půjde o nepopsané druhy, neboť se nám nepodařilo najít žádné již popsány tetratrichomonády, které by svými morfologickými znaky odpovídaly těmto liniím.

5.2.4. *Tetratrichomonas ovis*

Trichomonáda z ovčí byla v historii izolována několikrát. Původním autorem, který ji objevil a popsal byl, Robertson, 1932. Ten ji kvůli počtu předních bičíků pojmenoval *Ditrichomonas ovis*. V roce 1962 byl zachycen další nález trichomonády z ovce (Andersen et al., 1962). Ačkoli byly zachyceny určité změny v morfologii obou izolátů, autoři přesto potvrdili, že šlo o stejný druh. Objevili však větší počet předních bičíků a díky tomu tuto trichomonádu přejmenovali na *Trichomonas ovis*. Později byl díky dalším znakům (volný distální konec zpětného bičíku, diskovitý parabasální aparát) tento druh přejmenována na *Tetratrichomonas ovis*. V této chvíli je však zjevné, že se nejednalo o stejný druh. Významné rozdíly byly nalezeny ve velikosti buněk, tvaru těla buňky, v počtu předních bičíků (4 u „*T. ovis*“, 2 u *T. ovis*), výšce undulující membrány, velikosti pelty. Jako *Tetratrichomonas ovis* („pravá“) je podle principu priority ta, kterou jako první izoloval Robertson, 1932 a která měla původní název *Ditrichomonas ovis*. Izolát z roku 1962 (Andersen et al., 1962) je pro účely této práce označován jako „*Tetratrichomonas ovis*“, neboť zatím nebyl stanoven jiný název pro tento prokazatelně odlišný druh. Morfologicky shodný druh jako „*Tetratrichomonas ovis*“ byl pravděpodobně zachycen již v roce 1957 (Pavlov and Dimitrov, 1957) a v roce 1961 byl pojmenován *T. pavlovi* (Levine, 1961). Pokud by šlo o shodné organismy, druh „*Tetratrichomonas ovis*“ by mohl být nazýván *Tetratrichomonas pavlovi*.

Naše izoláty z nové linie ovčí se však překvapivě neshodují ani s jedním z předchozích druhů. Ač by dle společného hostitele mohlo být předpokládáno, že tato linie se bude shodovat s „*T. ovis*“, morfologicky spíše odpovídá již zmíněné *T. didelphidis*. „*T. ovis*“ spíše odpovídají zástupci linie 10. Tato problematika zatím tedy není zcela vyřešena a bude potřeba dalšího výzkumu.

Závěrečné shrnutí

Na základě našich výsledků byly potvrzeny předchozí analýzy rodu *Tetratrichomonas*. V rámci skupiny A se nám podařilo objevit novou linií ovcí. Spolu s touto novou linií je skupina A tvořena 13 liniemi. Pozice nové linie ovcí je však zatím nejasná a bude proto potřeba dalších výzkumů. Jelikož bylo zjištěno, že příslušné linie se liší i morfologicky, byly popsány znaky jednotlivých linií. Na základě tohoto morfologického popisu byly příslušné linie či skupiny linií popsány jako druhy ve smyslu morfospecies. Bylo také zjištěno, že se od sebe morfologicky liší i obě skupiny rodu *Tetratrichomonas*. Skupina B je charakteristická širším axostylem a převahou buněk se čtyřmi předními bičíky.

Na základě provedené morfologické analýzy jednotlivých linií bylo zkoumáno, zda se některé z linií neshodují s druhy již popsány. Linie 1 a 2, které byly morfologicky shodné, pravděpodobně reprezentují druh *Tetratrichomonas ovis*. U linie 4 a 5 byly potvrzeny předchozí předpoklady a dle našeho názoru se skutečně jedná o druh *Tetratrichomonas brumpti*. Podobně tomu bylo u linie 7, kde bylo potvrzeno zařazení ke druhu *Tetratrichomonas buttreyi*, který byl izolován z prasat. Určité shodné znaky jsme objevili mezi linií 10 a druhem „*Tetratrichomonas ovis*“. Nová linie ovcí byla předběžně určena jako druh *Tetratrichomonas didelphidis*, nicméně u obou linií je toto přiřazení zatím poměrně nejisté a bude potřeba dalších analýz.

Seznam citované literatury

Adl SM, Leander BS, Simpson AGB, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge DJ, Mann DG, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Smirnov AV, Spiegel F (2007) Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology* 56: 684 – 689.

Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Broeser SS, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell E, Mozley-Stanridge SE, Parfrey L, Pawlowski J, Rueskert S, Shadwick L, Schoch C, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The revised classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59(5): 429 – 493.

Alexeieff A (1910) Sur les flagellés intestinaux des poissons marins. *Archs Zool. Exp. Gén.* 6: 1 – 20.

Alexeieff A (1911) Sur la spécification dans le genre *Trichomonas* Donné. *C.R. Soc. Biol.* (Paris) 71: 539 – 541.

Andersen FL, Levine ND, Hammond DM (1962) The morphology of *Trichomonas ovis* from the cecum of domestic sheep. *Journal of Parasitology* 48: 589 – 595.

Andersen FL and Reilly JR (1965) The anatomy of *Tetratrichomonas didelphidis* (Hegner and Ratcliffe, 1927) comb. n. from the opossum. *Journal of Parasitology* 51: 913 – 921.

Brugerolle G (1991a) Flagellar and cytoskeletal system in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metamonada and Parabasalia. *Protoplasma* 164: 70 – 90.

Brugerolle G (1991b) Cell Organization in Free-living Amitochondriate Heterotrophic Flagellates. In Patterson DJ, Larsen J (eds) The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates. *Clarendon Press, Oxford*, pp 133 – 148.

Brugerolle G, Viscogliosi E (1994) Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. *Biology of the Cell* 81: 277 – 285.

- Cavalier-Smith T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 297 – 354.
- Cepicka I, Kutišová K, Tachezy J, Kulda J, Flegr J (2005) Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Veterinary Parasitology* 128: 11 – 21.
- Cepicka I, Hampl V, Kulda J, Flegr J (2006) New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 542 – 551.
- Cepicka I, Hampl V, Kulda J (2010) Critical taxonomical revision of parabasalids with descriptions of one new genus and three new species. *Protist* 161: 400 – 433.
- Cobo AR, Campero CM, Mariante RM, Benchimol M (2003) Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from preputial smegma of virgin bulls. *Veterinary Parasitology* 117: 195 – 211.
- Corbeil LB, Campero CM, Hoosear Van K, BonDurant RH (2008) Detection of trichomonas species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. *Veterinary Parasitology* 154: 226 – 232.
- Dimasuay KGB and Rivera WL (2013) Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology* 196: 289 – 295.
- Dobell C, Leidlaw PP (1926) On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* 18: 283 – 318.
- Dufernez F, Walker RL, Noël C, Caby S, Mantini C, Delgado-Viscogliosi P, Okhuma M, Kudo T, Capron M, Pierce RJ, Villanueva MR, Viscogliosi E (2007) Morphological and molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 161 – 168.
- Grassé PP (1926) Contribution à l'étude des flagellés parasites. *Arch. Zool Exper. Gen* 65: 345 – 602.

Hampl V, Cepicka I, Flegr J, Tachezy J, Kulda J (2004) Critical analysis of the topology and rooting of the parabasalian 16S rRNA tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 711 – 723.

Hampl V, Cepicka I, Flegr J, Tachezy J, Kulda J (2007) Morphological and molecular diversity of the monocercomonadid genera *Monocercomonas*, *Hexamastix*, and *Honigbergiella* gen. nov. *Protist* 158: 365 – 383.

Hegner RW and Ratcliffe H (1927) Trichomonads from the vagina of the monkey, from the mouth of the cat and man, and from the intestine of the monkey, opossum and prairie-dog. *Journal of Parasitology* 14: 27 – 35.

Hibler CP, Hammond DM, Caskey FH, Johnson AE, Fitzgerald PR (1960) The morphology and incidence of the trichomonads of swine, *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond), *Tritrichomonas rotunda*, n. sp. and *Trichomonas buttreyi*, n. sp. *Journal of Protozoology* 7: 159 – 171.

Honigberg BM (1951) Structure and morphogenesis of *Trichomonas prowazeki* Alexeieff and *Trichomonas brumpti* Alexeieff. *University of California Publications in Zoology* 55: 337 – 394.

Honigberg BM (1963) Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *Journal of Protozoology* 10: 20 – 63.

Huby-Chilton F, Scandrett BW, Chilton NB, Gajadhar AA (2009) Detection and identification of *Tetratrichomonas* in a preputial wash from a bull by PCR and SSCP. *Veterinary Parasitology* 166: 199 – 204.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754 – 755.

Ibañez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Delclaux M, Martinez-Nevado E, Ponce-Gordo F (2013) Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Research in Veterinary Science* 95: 176 – 181.

Jensen EA, Hammond DM (1964) A morphological study of trichomonads and related flagellates from the bovine digestive tract. *Journal of Protozoology* 11: 386 – 394.

- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research* 30: 3059 – 3066.
- Kirby H and Honigberg BM (1950) Intestinal flagellates from a wallaroo, *Macropus robustus*. *University of California Publications in Zoology* 55: 35 – 66.
- Kozloff EN (1945) The morphology of *Trichomonas limacis* Dujardin. *Journal of Morphology* 77: 53 – 31.
- Kutisova K, Kulda J, Cepicka I, Flegr J, Koudela B, Tachezy J (2005) Tetratrichomonads from oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology* 131: 309 – 319.
- Laing ST, Weber ES III, Yabsley MJ, Shock BC, Grosset C, Petritz OA, Barr B, Reilly CM, Lowenstine LJ (2013) Fatal hepatic tetratrichomoniasis in a juvenile Waldrapp ibis (*Geronticus eremita*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25: 277 – 281.
- Levine ND (1961) Protozoan parasites of domestic animals and of man. *Burgess Publishing Co.*, Minneapolis, Minnesota.
- Mantini C, Souppart L, Noël C, Duong TH, Mornet M, Carroger G, Dupont P, Masseret E, Goustille J, Capron M, Duboucher C, Dei-Cas E, Viscogliosi E (2009) Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 2236 – 2339.
- McDowell S (1953) A morphological and taxonomical study of the caecal protozoa of the common fowl, *Gallus gallus*. *Journal of Morphology* 92: 337 – 399.
- Pavlov P and Dimitrov S (1957) Über eine neue Trichomonasart bei Kälbern. *Trichomonas bovis* sp. n. *Zentralbl. Bakt. I. Orig.* 168: 293 – 297.
- Rivera WL, Lupisan AJB, Baking JMP (2008) Ultrastructural study of a tetratrichomonad isolated from pig fecal samples. *Parasitology Research* 103: 1311 – 1316.
- Robertson A (1932) Note on a *Trichomonas* sp. cultivated from the gut of a sheep. *Ditrichomonas ovis*. *The Veterinary Journal* 88: 151 – 157.

Smejkalova P, Petrzelkova KJ, Pomajbikova K, Modry D, Cepicka I (2012) Extensive diversity of intestinal trichomonads of non-human primates. *Parasitology* 139: 92 – 102.

Stamakis A (2006) RAXML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousand of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688 – 2690.

Tachezy J, Tachezy R, Hampl V, Šedinová M, Vaňáčová Š, Vrlík M, van Ranst M, Flegr J, Kulda J (2002) Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 154 – 163.

Tasca T, De Carli GA, Glock L, Jeckel-Neto EA (2001) Morphologic aspects of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from opossum *Didelphis marsupialis* and *Lutreolina crassicaudata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 96(2): 265 – 271.

Tasca T and De Carli GA (2004) Electron microscopic study of *Tetratrichomonas didelphidis* an its interaction with a prokaryotic cell. *Parasitology Research* 92: 106 – 109.

Tasca T and De Carli GA (2007) Morphological study of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from opossum *Lutreolina crassicaudata* by scanning electron microscopy. *Parasitology Research* 100: 1385 – 1388.

Wenrich DH, Saxe LH (1950) *Trichomonas microti*, n. sp. (Protozoa, Mastigophora). *Journal of Parasitology* 36: 261 – 169.

Yubuki N, Céza V, Cepicka I, Yabuki A, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I, Leander BS (2010) Cryptic diversity of free-living Parabasalids, *Pseudotrichomonas keilini* and *Lacusteria Cyprica* n. gen., n. sp., as inferred from small subunit rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57: 554 – 561.